



**Ana Isabel Martins
Novais Padrão**

**Estudo das PTMs do citocromo c cardíaco: efeitos
do envelhecimento**



**Ana Isabel Martins
Novais Padrão**

**Estudo das PTMs do citocromo c cardíaco: efeitos
do envelhecimento**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Coordenadora Convidada do Instituto Politécnico de Saúde – Norte, CESPU.

Apoio financeiro da FCT
(PTDC/DES/7075/2006) no âmbito do
III Quadro Comunitário de Apoio

dedicatória

Dedico ao meu avô António

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José Alberto Ramos Duarte
professor catedrático da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora coordenadora convidada do Instituto Politécnico de Saúde – Norte, CESPU

agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Doutor Francisco Amado e Professora Doutora Rita Ferreira, agradeço a inextinguível orientação científica que me proporcionaram, bem como as críticas construtivas e as oportunas sugestões que me colocaram ao longo deste percurso e que em muito contribuíram para o meu enriquecimento científico. Gostaria, ainda, de agradecer a disponibilidade incondicional e pelo exemplo dedicação, trabalho e busca de conhecimento.

Ao Doutor Rui Vitorino pelos seus valiosos ensinamentos de espectrometria de massa e pelo incansável acompanhamento e ajuda no trabalho laboratorial. Também pela generosidade e dedicação que me servem de exemplo.

À Cristina pelo acompanhamento, ajuda, incentivo, simpatia e boa disposição inesgotável ao longo deste trabalho.

Ao Renato, obrigada pela ajuda constante e crucial e por estares disponível para aquelas explicações que fazem a diferença. Também pela boa disposição e pelos momentos de descontração e diversão.

À Cláudia, ao Armando e ao Miguel pela ajuda, disponibilidade, ajuda e sobretudo pelos bons momentos que passamos.

A todo o grupo de espectrometria de massa pela disponibilidade e simpatia com que sempre me receberam.

Às minhas colegas de mestrado, em especial à Ana Lúcia, à Susana e à Dina pela partilha de experiências e pelos momentos de descontração e diversão.

Aos meus amigos de longa data por compreenderem a minha ausência e, em especial, à Susana, ao Raúl, ao Carlos, ao Paulo, à Cidália e à Ana Luísa pela paciência, incentivo e apoio constante.

Aos meus pais, irmã e avó, pelo apoio incondicional e por serem o meu suporte em todas as etapas da minha vida. Sem a vossa força e afecto nunca teria conseguido chegar a este momento.

palavras-chave

Mitocôndria, coração, envelhecimento, citocromo c, modificações pós-traducionais, proteômica

resumo

Os mecanismos celulares e bioquímicos subjacentes à disfunção cardíaca associada ao envelhecimento encontram-se pouco esclarecidos e, menos compreendido é o papel do estilo de vida neste processo. No sentido de avaliar a influência do estilo de vida ao longo da vida na potencial perda de funcionalidade das proteínas cardíacas, em particular do citocromo c, utilizaram-se ratinhos C57BL/6 machos que foram sujeitos a um protocolo experimental para simular o envelhecimento sedentário e activo. Os animais foram depois sacrificados, isolaram-se as mitocôndrias do coração e procedeu-se à análise de vários parâmetros bioquímicos com o intuito de (i) avaliar a funcionalidade da cadeia respiratória mitocondrial, (ii) identificar as proteínas susceptíveis à carbonilação e/ou nitração, (iii) caracterizar as PTMs do citocromo c de coração. Os resultados obtidos sugerem a existência de uma relação entre a perda de funcionalidade mitocondrial associada ao envelhecimento e o aumento do teor de proteínas carboniladas e/ou nitradas. Como proteínas alvo destas modificações pós-traducionais (PTMs) foram identificadas várias subunidades dos complexos da fosforilação oxidativa. Pela sua importância neste sistema metabólico, analisou-se mais exaustivamente a susceptibilidade do citocromo c a PTMs resultantes de processos oxidativos e de que forma o estilo de vida regula este processo. Apesar de se ter verificado um aumento da expressão do citocromo c com o envelhecimento, o número e o tipo de PTMs identificadas por LC-MS/MS não seguiu a mesma tendência. Efectivamente, identificou-se um maior número de PTMs no citocromo c do homogeneizado total dos ratinhos jovens (12 PTMs) do que nos ratinhos velhos. Considerando o efeito do estilo de vida, verificou-se a existência nos animais activos de um maior número de resíduos de aminoácidos modificados (10 PTMs) do que nos sedentários (6 PTMs). Curiosamente, a oxidação da Met⁶⁵ foi a única modificação oxidativa identificada no citocromo c da fracção mitocondrial, tendo sido observada nos ratinhos velhos sedentários.

keywords

Mitochondria, heart, aging, cytochrome c, post-translational modifications, proteomics

abstract

Cellular and biochemical mechanisms underlying the age-related cardiac dysfunction are not fully understood and, even less clarified is the influence of lifestyle in this process. In order to evaluate the role of lifelong lifestyle in the mitochondrial plasticity and in the potential functionality loss of cardiac proteins, in particular cytochrome c, to post-translational modifications (PTMs), C57BL/6 male mice were subjected to an experimental protocol simulating sedentary and active aging. After animal sacrifice, mitochondria from cardiac muscle were isolated and several biochemical parameters were measured (i) to evaluate the mitochondrial respiratory chain functionality, (ii) to identify the susceptible proteins to carbonylation and/or nitration, (iii) to characterize the PTMs of cardiac cytochrome c. The results suggest a link between the age-related decrease in mitochondrial functionality and the higher susceptibility of cardiac muscle proteins to oxidative damage. Indeed, we observed a significant increase in the content of carbonylated and/or nitrated proteins in old mice, being the oxidative phosphorylation subunits the most affected. Given the importance of cytochrome c as the final mobile electron carrier in this metabolic process, its susceptibility to PTMs induced by oxidative stress was characterized more exhaustively. Despite the age-induced upregulation of cytochrome c, the number of oxidative PTMs identified by LC-MS/MS was not increased. Indeed, a higher number of PTMs was identified in cytochrome c from young mice total homogenate (12 PTMs) compared to old mice. Regarding the effect of lifestyle, old active mice presented more PTMs (10 PTMs) than their sedentary counterparts (6 PTMs). Interestingly, the Met⁶⁵ oxidation was the only PTM identified in mitochondrial cytochrome c and only in old sedentary mice.

Índice

I – Introdução	1
II – Revisão da literatura	5
1.Processo de Envelhecimento	7
2.Mitocôndria e o Envelhecimento	8
3.Cadeia transportadora de electrões	13
3.1 Composição da cadeia transportadora de electrões	14
3.2 Fluxo de electrões ao longo da cadeia respiratória	17
3.3 Organização da cadeia respiratória	18
4.Stress oxidativo mitocondrial.....	22
4.1 Mitocôndria – Produção de espécies reactivas	22
4.2 Mitocôndria – Sistema antioxidante	26
5.Modificações pós-traducionais das proteínas	29
6.Acumulação de proteínas oxidadas e envelhecimento	34
7.Citocromo c	35
7.1 Estrutura do citocromo c	36
7.2 Modificações pós-traducionais do Citocromo c	38
8.Influência da actividade física ao longo da vida no envelhecimento mitocondrial.....	43
9.Objectivos.....	44
III – Material e Métodos.....	47
1.Desenho experimental.....	49
2.Protocolo animal e experimental	50
3.Isolamento de mitocôndrias do músculo cardíaco	50
4.Determinação da actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	51
5.Separação do citocromo c da fracção mitocondrial e do homogeneizado total do coração de ratinho por SDS-PAGE	53
5.1.Preparação das amostras.....	53

5.2 Electroforese SDS-PAGE	53
6. Western-blotting para determinação do teor de citocromo c e de nitração	54
7. Western-blotting para determinação do teor de grupos carbonilos	55
8. Identificação de proteínas do músculo cardíaco e caracterização das PTMs do citocromo c	55
8.1 Preparação das amostras para análise por espectrometria de massa	55
8.2 Separação dos digestos trípticos por nano-HPLC	56
8.3. Identificação de proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF	56
8.4. Identificação e confirmação das modificações oxidativas por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF	57
8.5 Estudo <i>in vitro</i> das PTMs do citocromo c de coração de cavalo	57
9. Análise Estatística	59
IV – Resultados	61
<i>A - Estudo da influência do estilo de vida na plasticidade muscular cardíaca</i>	63
1. Efeito do exercício físico ao longo da vida na plasticidade mitocondrial cardíaca	63
2. Avaliação da actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	64
3. Efeito do envelhecimento e da prática de exercício físico ao longo da vida na expressão de citocromo c cardíaco	67
4. Efeito do envelhecimento e do exercício físico na susceptibilidade das proteínas do coração à carbonilação e nitração	68
<i>B - PTMs do citocromo c cardíaco</i>	75
1. Identificação e caracterização das PTMs do citocromo c cardíaco	75
1.1 Estudo <i>in vitro</i> das PTMs do citocromo c cardíaco	75
1.2 Estudo <i>in vivo</i> das PTMs do citocromo c de coração de ratinho	81
V – Discussão	87
<i>A - Estudo da influência do estilo de vida na plasticidade do músculo cardíaco</i>	89
1. Efeito do estilo de vida na adaptação mitocondrial cardíaca	89

2. Alterações da actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial associadas ao envelhecimento e ao estilo de vida.....	92
3.Efeito do envelhecimento e do estilo de vida na susceptibilidade das proteínas à carbonilação e nitração.....	95
<i>B - Estudo das PTMs do citocromo c cardíaco</i>	<i>100</i>
1.Identificação e caracterização das PTMs do citocromo c cardíaco.....	100
VI – Conclusão.....	105
VII – Referências Bibliográficas	109

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura de uma mitocôndria (adaptado de www.cartage.org.lb/.../mitochondria.jpg).	9
Figura 2: Representação esquemática da estrutura de um cardiomiócito. As mitocôndrias cardíacas consistem em duas populações funcionalmente distintas. Mitocôndrias subsarcolemais estão situadas abaixo do sarcolema, enquanto as intermiofibrilares estão localizadas junto da miofibrilas (Lesnefsky and Hoppel 2006).	11
Figura 3: Representação esquemática da cadeia transportadora de electrões (Navarro and Boveris 2007).	14
Figura 4: Fluxo de electrões ao longo dos complexos da cadeia respiratória (Duchen 2004).	17
Figura 5: Representação dos modelos propostos de organização do sistema de OXPHOS mitocondrial. a. o “modelo do estado fluído”. b. o “modelo do estado sólido” definindo as interacções dos complexos em supercomplexos. c. Modelo integrado do sistema de OXPHOS.	20
Figura 6: Modelo da plasticidade da organização do sistema OXPHOS mitocondrial proposto por Acín-Pérez et al (2008). Para simplificar todos os componentes estão representados como monómeros. I-V – complexos I-V; Q- Coenzima Q, C- citocromo c (Schon and Dencher 2009).	21
Figura 7: Locais de produção de ROS na cadeia respiratória mitocondrial (Figueiredo, Mota et al. 2008).	24
Figura 8: Estrutura tridimensional do citocromo c. Os quatro resíduos de tirosina estão representados a amarelo. Adicionalmente a estrutura mostra o grupo heme (vermelho) e os seus ligandos, quinto e sexto, His-18 (azul) e Met-80 (verde), respectivamente. (Souza, Castro et al. 2008).	38
Figura 9: Esquema representativo da sequência dos procedimentos técnicos utilizados na análise de diversos parâmetros bioquímicos no músculo cardíaco de ratinhos jovens, velhos activos e velhos sedentários.	49
Figura 10: Efeitos do envelhecimento e do exercício na actividade da NADH-ubiquinona oxidoreductase (C-I; U/g proteína), succinato-ubiquinona oxidoreductase (C-II; nmol/min/mg proteína), da citocromo c oxidase (C-IV; nmol/min/mg proteína) e da ATP	

sintetase (C-V; nmol Pi/min/mg proteína). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão..... 65

Figura 11: Efeitos do envelhecimento e do exercício na actividade da NADH-ubiquinona oxidoreductase (C-I; U/ μ g mtDNA), succinato-ubiquinona oxidoreductase (C-II; nmol/min/ μ g mtDNA), da citocromo c oxidase (C-IV; nmol/min/ μ g mtDNA) e da ATP sintetase (C-V; nmol Pi/min/ μ g mtDNA). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão..... 66

Figura 12: A – Efeitos do envelhecimento e exercício físico na expressão do citocromo c mitocondrial. B – Imagem representativa do Western-blotting. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD)..... 67

Figura 13: A – Efeito do envelhecimento e do exercício físico na expressão do citocromo c no homogeneizado total. B – Imagem representativa do Western-blotting. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD)..... 68

Figura 14: A – Efeito do envelhecimento e do exercício físico no teor total de carbonilação das proteínas cardíacas. B – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD). 69

Figura 15: A – Efeito do envelhecimento e do exercício físico no teor total de grupos carbonilos na fracção mitocondrial. B – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD). 69

Figura 16: A - Efeitos do envelhecimento e do exercício físico no teor de 3-nitrotirosina no músculo cardíaco. B – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD). 72

Figura 17: A - Efeitos do envelhecimento e do exercício físico no teor de 3-nitrotirosina na fracção mitocondrial. B – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD). 73

Figura 18: Alinhamento da sequência primária do citocromo c de *Equus caballus* (P0004) e de *Mus musculus* (P62897)..... 75

Figura 19: Representação esquemática dos péptidos modificados pelo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e localização na estrutura primária do citocromo c de coração de cavalo.	75
Figura 20: Espectros de MS/MS representativos após a análise com o software DeNovo Explorer. A- A fragmentação do ião com $m/z=1311,6451$ revelou o péptido KTGPLNLHGLFGR, onde o resíduo K apresenta um desvio de 14,9632Da, correspondente à oxidação da lisina 27 a ácido α -aminoadípico. B- A fragmentação do ião com $m/z=1511,6497$ revelou o péptido EETLMEYLENPK, onde o resíduo M apresenta um desvio de 15,9949Da, correspondente à oxidação 65. C- A fragmentação do ião com $m/z=2299,1426$ revelou o péptido EETLMEYLENPKKYIPGTK, onde o resíduo Y apresenta um desvio de 15,9949Da, correspondente à hidroxilação da tirosina 74. A vermelho encontram-se representados os picos de massa correspondentes aos iões b e a verde os picos de massa correspondentes aos iões Y.	78
Figura 21: PTMs identificadas e sua localização na estrutura primária do citocromo c de coração de cavalo.	80
Figura 22: Relação entre o número total de cada resíduo de aminoácidos (vermelho) e o número de resíduos modificados (azul).	80
Figura 23: A - Imagem representativa de SDS-PAGE do homogeneizado total dos grupos experimentais. B – Imagem representativa de SDS-PAGE da fracção mitocondrial dos grupos experimentais.	81
Figura 24: PTMs identificadas e sua localização na estrutura primária do citocromo c de coração de ratinho no homogeneizado total.	84
Figura 25: Espectro de MS/MS do péptido modificado oxidativamente GITWGETLMEYLENPK, com a $m/z=2011,87$, onde o resíduo M apresenta um desvio de +16Da, correspondente à oxidação da metionina 65.	85

Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista de proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial de <i>Mus musculus</i> obtido de <i>Genome database</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez), número de acesso NC_005089.	12
Tabela 2: Modificações oxidativas listadas na UNIMOD Web site que foram pesquisas com <i>Global Protein Server</i>	58
Tabela 3: Efeito do envelhecimento e do exercício físico na massa corporal do ratinho, na massa do coração e na relação massa de coração/massa corporal. Os resultados são expressos como media \pm desvio padrão.	63
Tabela 4: Efeitos do envelhecimento e do exercício físico ao longo da vida na concentração de proteína mitocondrial e concentração de mtDNA. Os resultados são expressos como media \pm desvio padrão.	64
Tabela 5: Proteínas identificadas nas bandas do gel de SDS-PAGE correspondentes às bandas carboniladas após análise por Western-blotting no homogeneizado total e na fração mitocondrial (para um <i>Protein score</i> superior a 95%).	71
Tabela 6: Proteínas identificadas nas bandas do gel de SDS-PAGE correspondentes às bandas positivamente marcadas com anti-3-nitrotirosina após análise por Western-blotting no homogeneizado de músculo cardíaco e na fração mitocondrial (para um <i>Protein score</i> superior a 95%).	74
Tabela 7: Lista das modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados correspondem aos modificados).	76
Tabela 8: Lista das modificações oxidativas identificadas no citocromo c de coração de cavalo.	79
Tabela 9: Lista das modificações pós-traducionais do citocromo c no homogeneizado total e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados correspondem aos modificados; \surd significa presença da modificação).	83
Tabela 10: Modificações pós-traducionais identificadas no citocromo c no homogeneizado total para os grupos experimentais (\surd significa presença da modificação).	84

Índice de Quadros

Quadro 1: Sequência de resíduos de aminoácidos do citocromo c somático de *Mus musculus* (house mouse) de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), número de acesso NP_031834. (Os resíduos conservados encontram-se representados a negrito. A vermelho encontram-se representados os resíduos susceptíveis ao ONOO⁻.....37

Quadro 2: Sequência de resíduos de aminoácidos do citocromo c de *Equus caballus* obtido de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), número de acesso P00004. (Os resíduos conservados encontram-se representados a negrito. A vermelho encontram-se representados os resíduos susceptíveis ao ONOO⁻).....37

Lista de Siglas

ADP	Adenosina Difosfato
AF	Ácido Fórmico
APS	<i>Ammonium persulphate</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BN-PAGE	<i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CN-PAGE	<i>Clear-native polyacrylamide gel electrophoresis</i>
CoQ	Coenzima Q
CuZnSOD	Cobre-Zinco superóxido dismutase
DNA	Ácido desoxiribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ETC	Cadeia transportadora de electrões
FAD	Dinucleotídeo de flavina-adenina
FADH₂	Flavine adenine dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GJ	Grupo jovem
GPx	Peroxidase glutational
GVA	Grupo velho activo
GVS	Grupo velho sedentário
ILAR	Institute for Laboratory Animal Research
IMF	Mitocôndrias intermiofibrilares
iNOS	Óxido nítrico induzível
MALDI	Ionização por desorção por laser assistida pela matriz
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa <i>tandem</i>
mtDNA	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
mtNOS	Óxido nítrico mitocondrial
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
nDNA	Ácido desoxiribonucleico nuclear

nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintetase
OD	Densidade óptica
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
pI	Ponto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PTMs	Modificações pós-traducionais
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reactivas de azoto
RONs	Espécies reactivas de oxigénio e azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SODs	Superóxido dismutases
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SS	Mitocôndrias subsarcolemais
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TNM	Tetranitrometano
TOF	Tempo-de-voo
tRNAs	Ácidos ribonucleicos de transferência

I.Introdução

A população Mundial e Portuguesa, em particular, estão a envelhecer. Em Portugal a população idosa (com idade igual ou superior a 65 anos de idade) representava 17,3% em 2006. Esta proporção ultrapassa a média encontrada para a União Europeia dos 27 (16,9%) e União Europeia dos 25 (17,0%), referente ao mesmo ano. Dentro da população idosa, o crescimento é mais evidente nos idosos mais velhos (com idade superior ou igual a 80 anos), representando 4% da população idosa (Carrilho 2009).

As alterações demográficas da população são um fenómeno mundial que resulta no aumento da prevalência de doenças cardiovasculares associadas com o envelhecimento (Jahangir, Sagar et al. 2007). Em Portugal, as doenças do aparelho circulatório, nomeadamente as doenças cerebrovasculares e a doença isquémica cardíaca, encontram-se entre as principais causa de invalidez e mortalidade, sendo a terceira e quarta causa de anos potenciais de vida perdidos e a principal causa de morte em ambos os sexos (Ministério da Saúde 2004). Para o aumento do risco cardíaco contribuem algumas características de comportamento pouco saudáveis que a população Portuguesa apresenta. Os hábitos alimentares têm uma propensão cada vez maior para a presença de elevadas quantidades de sal, gorduras e açúcares e baixos níveis de fibras e vegetais. O tabagismo, apesar de considerado baixo para níveis europeus, ainda não se encontra controlado, demonstrando inclusivé uma tendência de crescimento entre jovens e mulheres. Aliado a estes factores, o sedentarismo atinge níveis elevados, mesmo entre a população activa. Assim, de entre as orientações estratégicas delineadas pelo Ministério da Saúde no âmbito do Plano Nacional de Saúde 2004-2010, encontra-se a promoção de estilos de vida saudáveis como forma de prevenção das doenças do aparelho circulatório, surgindo medidas para estimular o exercício físico e o desporto (Ministério da Saúde 2004). Frequentemente, é afirmado que a prática de exercício físico regular pode constituir uma excelente ferramenta na prevenção de diversas disfunções cardíacas, aumentando a tolerância do tecido cardíaco contra situações de stress (Powers, Quindry et al. 2004). No entanto, apesar de acordado que o exercício é benéfico para a saúde e longevidade, os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce estes efeitos ainda não são amplamente conhecidos (Judge and Leeuwenburgh 2007). Neste sentido, torna-se importante estudar as alterações do músculo cardíaco associadas ao envelhecimento e que possam potenciar o desenvolvimento de cardiomiopatias e de que forma o estilo de vida pode condicionar esses efeitos.

O coração possui grande abundância de mitocôndrias, podendo chegar a 30% do volume celular (Stowe 2009). A mitocôndria está intimamente ligada ao bom funcionamento do músculo cardíaco, pois estes organelos constituem uma importante fonte energética para a contração muscular (Chabi, Ljubicic et al. 2008). No entanto, quando disfuncional, a mitocôndria pode ser incapaz de satisfazer as exigências de ATP e comprometer a adaptabilidade celular ao stress fisiológico, contribuindo para a disfunção do músculo relacionado com a idade e com a redução da capacidade aeróbia (Figueiredo, Mota et al. 2008). Para além disso, a mitocôndria é considerada o principal local de produção celular de RONS, sendo estes subprodutos da cadeia transportadora de electrões (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009). Assim, as mitocôndrias não representam apenas o principal local de produção de RONS, mas também o principal alvo de danos oxidativos induzidos pelos RONS (Duchen 2004; Ott, Gogvadze et al. 2007; Trifunovic and Larsson 2008). Devido à proximidade da cadeia respiratória mitocondrial ao mtDNA, a produção de RONS pode resultar num ciclo vicioso de danos oxidativos, causando alterações progressivas no mtDNA e na função mitocondrial (Duchen 2004; Ott, Gogvadze et al. 2007; Trifunovic and Larsson 2008). Assim, oxidação das proteínas são uma consequência da vida aeróbia e devido às suas funções únicas, as modificações oxidativas das proteínas podem ter diversas consequências estruturais e funcionais (Chakravarti and Chakravarti 2007; Chung, Miranda et al. 2008). A oxidação das proteínas constitui um bom marcador do envelhecimento dos sistemas biológicos (Stadtman 2002).

Como proteína confinada ao espaço intermembranar mitocondrial e existindo em elevadas concentrações, o citocromo c é um dos principais alvos de RONS, e está, por isso sujeito a modificações pós-traducionais. Devido às importantes funções do citocromo c, como transportador móvel de electrões na cadeia respiratória e no processo de apoptose, danos oxidativos no citocromo c estão associadas a várias doenças e ao aumento da apoptose bem como parecem ter um importante papel no processo de envelhecimento (Kim, Rodriguez et al. 2008). Neste contexto, a avaliação da influência do estilo de vida na plasticidade mitocondrial e na susceptibilidade a modificações pós-traducionais das proteínas do músculo cardíaco e do citocromo c cardíaco, em particular, poderá ajudar a compreender os mecanismos celulares e bioquímicos subjacentes ao processo de envelhecimento e a doenças associadas à idade.

II – Revisão da literatura

II. Revisão da literatura

1. Processo de Envelhecimento

O processo de envelhecimento biológico caracteriza-se por uma progressiva deterioração dos sistemas fisiológicos com consequente redução da capacidade funcional e aumento da susceptibilidade a doenças (Phaneuf and Leeuwenburgh 2002; Judge and Leeuwenburgh 2007). Em termos gerais, o envelhecimento está associado a uma perda da capacidade do indivíduo em manter a homeostasia do meio interno quando confrontado com mudanças no meio externo (Vina, Borras et al. 2007). Nos organismos multicelulares, os diferentes tipos de células apresentam diferentes respostas ao envelhecimento. Os cardiomiócitos, os neurónios e outras células pós-mitóticas alteram-se drasticamente com o envelhecimento (Juhaszova, Rabuel et al. 2005; Terman and Brunk 2005; Vina, Borras et al. 2007; Petrosillo, Matera et al. 2009), enquanto que tecidos com células lábeis, como o epitélio intestinal e a medula óssea sofrem apenas pequenas alterações quase indetectáveis (Terman and Brunk 2005).

A estrutura do sistema cardiovascular sofre alterações subtis mas progressivas com a idade que comprometem a sua função. Estas alterações, de ordem anatómicas, ultra-estruturais, mecânicas e bioquímicas prejudicam ou condicionam a eficiência da resposta do coração envelhecido a diversos estímulos (Juhaszova, Rabuel et al. 2005). O coração é um tecido primariamente pós-mitótico e com grande abundância de mitocôndrias, tendo, por isso, um metabolismo altamente aeróbio. A função normal do coração depende da viabilidade das mitocôndrias e da célula (Judge and Leeuwenburgh 2007). Os cardiomiócitos são particularmente susceptíveis ao processo de envelhecimento devido, por um lado ao elevado consumo de oxigénio e, consequente, à elevada produção de ROS que induzem danos oxidativos e, por outro lado, à baixa capacidade regenerativa do miocárdio (Terman and Brunk 2005). Em termos gerais, o envelhecimento cardíaco é acompanhado por um aumento da pressão arterial sistólica e pressão diastólica normal ou diminuída, aumento da pulsação, dilatação e espessamento da parede da aorta (Juhaszova, Rabuel et al. 2005). Em termos celulares, o processo de envelhecimento do coração tem sido associado a uma diminuição do número total de miócitos, à hipertrofia das células remanescentes (Olivetti, Melissari et al. 1991; Hoppel, Moghaddas et al. 2002; Lakatta 2002; Phaneuf and Leeuwenburgh 2002; Lakatta 2003; Terman, Dalen et al. 2003; Terman and Brunk 2004; Juhaszova, Rabuel et al. 2005; Terman and Brunk 2005; Lesnefsky and Hoppel 2006; Bernhard and Laufer 2008) e ao aumento da fibrose do miocárdio (Lesnefsky, Gudz et al. 2001; Hoppel, Moghaddas et al.

2002; Lesnefsky and Hoppel 2006; Bernhard and Laufer 2008). A redução do número total de miócitos pode levar ao declínio da capacidade funcional cardíaca. Adicionalmente, a activação de processos de morte celular por apoptose parece ser um importante factor contribuinte para a perda de cardiomiócitos com a idade (Phaneuf and Leeuwenburgh 2002; Lakatta 2003). Alterações mitocondriais em cardiomiócitos envelhecidos têm sido descritas extensivamente (Terman, Dalen et al. 2003; Terman and Brunk 2004; Terman and Brunk 2005). Assim, o papel da mitocôndria no processo de deterioração de tecidos associado ao envelhecimento tem merecido particular atenção por muitos estudos com a ideia, gradualmente aceite, de que a disfunção mitocondrial é um factor importante para o envelhecimento (Trifunovic and Larsson 2008).

Várias alterações na morfologia e estrutura mitocondrial relacionadas com o envelhecimento têm sido descritas, nomeadamente a vacuolização da matriz (Figueiredo, Mota et al. 2008), a perda parcial das cristas e a destruição da membrana interna (Terman, Dalen et al. 2003; Terman and Brunk 2004; Rosa, Silva et al. 2005; Terman and Brunk 2005; Figueiredo, Mota et al. 2008). Estas mitocôndrias, geralmente, são maiores, sendo designadas de mitocôndrias “gigantes” (Terman, Dalen et al. 2003; Terman and Brunk 2004; Terman and Brunk 2005) e menos densas (Figueiredo, Mota et al. 2008). No entanto, exceptuando as alterações de número e tamanho, pouco é conhecido acerca da relação entre a morfologia mitocondrial e o envelhecimento (Figueiredo, Mota et al. 2008).

2.Mitocôndria e o Envelhecimento

As mitocôndrias são organelos que estão presentes no citoplasma de todas as células eucarióticas e são responsáveis pela produção de energia química via adenosina trifosfato (ATP) (Yaffe 1999; Koopman, Visch et al. 2005; Frazier, Kiu et al. 2006; Logan 2006; Benard and Rossignol 2008; Trifunovic and Larsson 2008). Adicionalmente, nas mitocôndrias residem uma série de enzimas que intervêm em vias metabólicas como no ciclo da ureia, na degradação dos ácidos gordos, na geração de calor, e na biosíntese do heme, pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, e nucleotídeos (Marin-Garcia and Goldenthal 2002; Bailey, Landar et al. 2005; Koopman, Visch et al. 2005; Frazier, Kiu et al. 2006; Logan 2006; Prokai, Yan et al. 2007; Benard and Rossignol 2008). Tem sido também demonstrado que este organelo tem um papel chave na morte celular programada ou apoptose (Van Remmen and Richardson 2001; Logan 2006).

As mitocôndrias são altamente plásticas e pleomórficas. Estes organelos têm, geralmente, forma oval, com cerca de 1-2µm de comprimento e 0,1-0,5µm de largura (Logan 2006) e são compostos por vários compartimentos, cada um com funções

metabólicas específicas, delimitadas por membranas (Duchen 2004; Logan 2006). Cada mitocôndria possui duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, que delimitam dois compartimentos, o espaço intermembranar (entre a membrana externa e interna) e a matriz mitocondrial (envolvida pela membrana interna) (Figura 1) (Frey and Mannella 2000; Duchen 2004; Logan 2006; Navarro and Boveris 2007; Benard and Rossignol 2008; Stowe 2009).

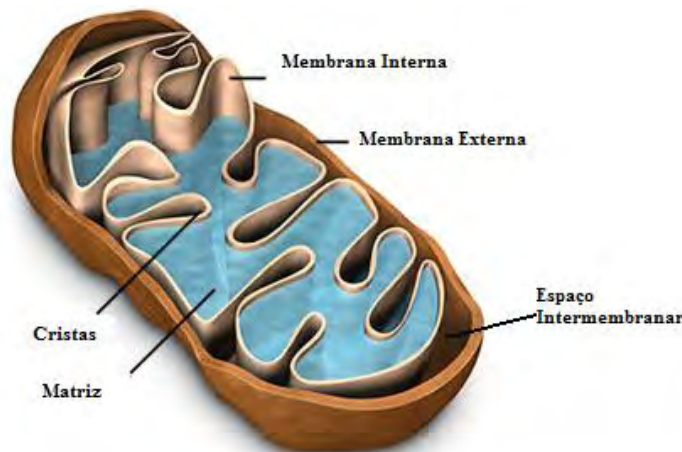


Figura 1: Representação esquemática da estrutura de uma mitocôndria (adaptado de www.cartage.org.lb/.../mitochondria.jpg).

A membrana externa delimita o organelo, enquanto a membrana interna rodeia a matriz. A membrana externa é relativamente permeável a pequenas moléculas e espécies iônicas (Duchen 2004), sendo impermeável a moléculas maiores do que 15000Da (Lesnefsky and Hoppel 2006). O espaço intermembranar localiza-se entre as duas membranas e é referido como um interessante microambiente do qual ainda se sabe pouco, mas onde existem um grupo de proteínas distintas que desempenham importantes funções na fisiologia, capacidade energética da célula e na morte celular programada – incluindo o citocromo c (Duchen 2004; Lesnefsky and Hoppel 2006) e a creatinina quinase (Duchen 2004). A membrana mitocondrial interna é muito impermeável e forma uma grande barreira entre o citosol e a matriz mitocondrial (Duchen 2004). Espécies químicas como aniões e pequenas moléculas atravessam a membrana interna via transportadores específicos. Na membrana interna estão ancoradas proteínas integrais que constituem os principais catalisadores da fosforilação oxidativa (Navarro and Boveris 2007). A membrana interna forma uma série de invaginações que se projectam para o espaço interior, as chamadas cristas mitocondriais. Estas cristas aumentam a sua área de superfície e, concomitantemente, a capacidade de produção de ATP (Duchen 2004; Lesnefsky and Hoppel 2006). A estrutura das cristas parece variar muito entre os tecidos, permanecendo algumas dúvidas quanto ao significado funcional

destas diferenças estruturais (Duchen 2004). No entanto, existe a indicação que o número de cristas é proporcional à actividade respiratória da célula. Estudos de microscopia electrónica, sugerem que as cristas mitocondriais não formam na realidade pregas paralelas, como descrito em muitos livros didácticos, mas formam complexos de arranjos tubulares, que podem estar continuamente em fusão e divisão (Scheffler 2001; Duchen 2004; Logan 2006).

As mitocôndrias apresentam uma espantosa plasticidade ao nível da forma, número e distribuição (Yaffe 1999; Collins, Berridge et al. 2002; Knowles, Guenza et al. 2002; Stowe 2009) entre tecidos e entre tipos de células (Rojo, Legros et al. 2002; Logan 2006; Stowe 2009). O número de mitocôndrias por célula é variável e é determinado pela função específica da célula e pelas necessidades energéticas (Logan 2006). As células do fígado têm cerca de 1000-2000 mitocôndrias por célula, ocupando 20% do volume celular e a área da membrana interna mitocondrial é cerca de cinco vezes maior do que a membrana externa mitocondrial. Nas mitocôndrias do músculo cardíaco o domínio das cristas é muito maior e o volume mitocondrial pode chegar a 30% do volume celular (Stowe 2009). A distribuição das mitocôndrias deve satisfazer as necessidades fisiológicas da célula (Dimmer and Scorrano 2006; Benard and Rossignol 2008; Stowe 2009). Tecidos com maiores necessidades energéticas apresentam, regra geral, maior número de mitocôndrias. Mesmo no interior de cada célula existe heterogeneidade mitocondrial (Duchen 2004; Koves, Noland et al. 2005; Logan 2006). No músculo estriado, cardíaco e esquelético, têm sido descritas duas subpopulações mitocondriais que podem existir continuamente em retículo, mas diferem de acordo com a localização subcelular, propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais. As mitocôndrias subsarcolemas (SS) encontram-se localizadas abaixo do sarcolema, têm forma lamelar e tamanho variável. É geralmente aceite que as intermiofibrilares (IMF) são mais pequenas e redondas e localizam-se entre os filamentos contrácteis (Figura 2) (Suh, Heath et al. 2003; Duchen 2004; Koves, Noland et al. 2005; Riva, Tandler et al. 2005; Lesnefsky and Hoppel 2006; Riva, Tandler et al. 2006; Huang and Hood 2009).

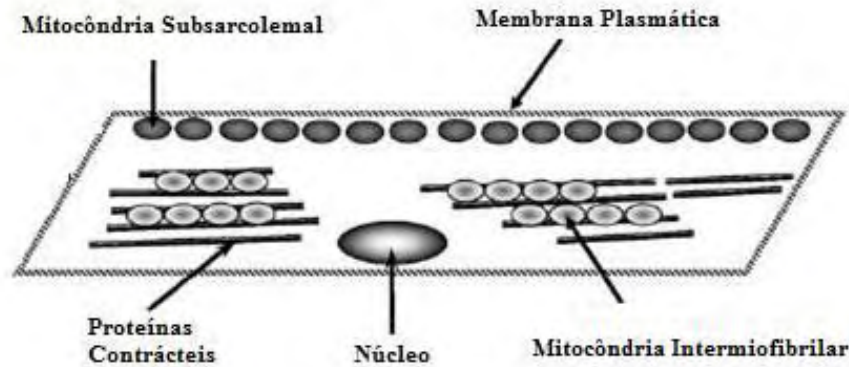


Figura 2: Representação esquemática da estrutura de um cardiomiócito. As mitocôndrias cardíacas consistem em duas populações funcionalmente distintas. Mitocôndrias subsarcolemais estão situadas abaixo do sarcolema, enquanto as intermiofibrilares estão localizadas junto da miofibrilas (Lesnefsky and Hoppel 2006).

Proporcionalmente o músculo estriado é composto por um maior volume de mitocôndrias IMF do que mitocôndrias SS. Estas subpopulações apresentam propriedades bioquímicas diferentes, de forma que as mitocôndrias IMF têm uma taxa de consumo de oxigénio mais elevada, maior produção de ATP, maior actividade enzimática, quando comparadas com as mitocôndrias SS. Curiosamente, apesar de as mitocôndrias SS apresentarem uma menor percentagem do volume total de mitocôndrias na célula, estas parecem apresentar maior sensibilidade a perturbações externas como as induzidas pela prática de exercício físico, quando comparadas com as mitocôndrias IMF. Estas duas subpopulações mitocôndriais parecem ser reguladas de forma diferente durante o processo de envelhecimento (Huang and Hood 2009).

As mitocôndrias ocupam uma posição única na estrutura celular, na medida em que possuem um genoma próprio e toda a maquinaria para a transcrição e tradução. O genoma mitocondrial é constituído normalmente por uma molécula circular de DNA em cadeia dupla. O DNA mitocondrial (mtDNA) está localizado na matriz, por vezes ligado à membrana interna. Esta pequena molécula de cerca de 16 kb que não possui intrões, codifica 37 genes, dos quais 13 dão origem a proteínas todas pertencentes à cadeia transportadora de electrões (ETC), 2 rRNAs (16S e 12S) e 22 tRNAs (Scheffler 2001; Marin-Garcia and Goldenthal 2002; Duchon 2004; Logan 2006; Johnson, Harris et al. 2007; Kang, Kim et al. 2007; Meissner 2007; Terzioglu and Larsson 2007; Trifunovic and Larsson 2008). Todos os produtos resultantes da tradução do mtDNA foram identificados: 3 são subunidades do complexo citocromo c oxidase (complexo IV), 2 são subunidades da ATPase (complexo V), 7 são subunidades NADH-CoQ reductase (complexo I) e uma (citocromo b) é subunidade do complexo CoQ-citocromo c reductase (complexo III) (Scheffler 2001) (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial de *Mus musculus* obtido de *Genome database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), número de acesso NC_005089.

Proteínas codificadas	comprimento	Gi	GeneID	Locus
NADH desidrogenase subunidade 1	318	34538598	17716	ND1
NADH desidrogenase subunidade 2	345	34538599	17717	ND2
Citocromo c oxidase subunidade I	514	34538600	17708	COX1
Citocromo c oxidase subunidade II	227	34538601	17709	COX2
ATP sintetase F₀ subunidade 8	67	34538602	17706	ATP8
ATP sintetase F₀ subunidade 6	226	34538603	17705	ATP6
Citocromo c oxidase subunidade III	261	34538604	17710	COX3
NADH desidrogenase subunidade 3	115	34538605	17718	ND3
NADH desidrogenase subunidade 4L	98	34538606	17720	ND4L
NADH desidrogenase subunidade 4	459	34538607	17719	ND4
NADH desidrogenase subunidade 5	607	34538608	17721	ND5
NADH desidrogenase subunidade 6	172	34538609	17722	ND6
Citocromo b	381	34538610	17711	CYTB

O mtDNA é tradicionalmente considerado “despido” devido à ausência de histonas (Garesse and Vallejo 2001; Turrens 2003; Duchon 2004; Harper, Bevilacqua et al. 2004; Terman and Brunk 2005; Huang and Hood 2009), encontrando-se, por isso, mais susceptível a sofrer danos oxidativos (Duchon 2004; Huang and Manton 2004; Terman and Brunk 2005). A manutenção do genoma mitocondrial é inequivocamente importante, e contribui para a integridade e funcionalidade da célula (Kang, Kim et al. 2007; Meissner 2007). No entanto, o mtDNA possui menos mecanismos de reparação do que o DNA nuclear (Turrens 2003; Huang and Hood 2009). Um defeito na síntese de 1 das 13 subunidades respiratórias codificadas pelo mtDNA pode levar à disfunção da cadeia respiratória mitocondrial e a muitas condições patológicas tais como doenças neurodegenerativas ou cancro (Joseph, Rungi et al. 2004).

Apesar de a mitocôndria conter o seu próprio genoma e maquinaria própria, é apenas semi-autónoma. A maioria dos polipeptídeos mitocôndriais são codificados pelo genoma nuclear, traduzidos no citosol e importados para a mitocôndria (Poyton and McEwen 1996; Duchon 2004; Bailey, Landar et al. 2005; Logan 2006; Meissner 2007; Trifunovic and Larsson 2008; Huang and Hood 2009). Estudos de proteómica indicam a existência de cerca de 800 (nas leveduras) e 1500 (nos humanos) proteínas diferentes na mitocôndria (Trifunovic and Larsson 2008), embora as estimativas mais conservadoras apontem para aproximadamente 1000 proteínas (Scheffler 2001). Isto indica que o genoma mitocondrial só codifica apenas algumas proteínas mitocondriais (cerca de 1%)

(Poyton and McEwen 1996; Terzioglu and Larsson 2007; Trifunovic and Larsson 2008). A biogénese da ETC é, portanto, dependente de uma relação intrínseca e, ainda, pouco compreendida entre o genoma nuclear e a mitocôndria. Além disso, o mtDNA é completamente dependente de proteínas codificadas no núcleo, tanto para a sua manutenção como expressão (Trifunovic and Larsson 2008).

No músculo cardíaco em particular, uma célula contém, normalmente, múltiplas mitocôndrias (50-100) e cada mitocôndria contém cópias múltiplas de mtDNA (1-10 moléculas/mitocôndria) (Marin-Garcia and Goldenthal 2002). O tempo médio de vida de uma mitocôndria varia entre 18 a 24 dias para os neurónios e 18 dias para os miócitos. Todas as cópias de mtDNA são constantemente renovadas, independentemente do ciclo celular, juntamente com as mitocôndrias (Meissner 2007). Quando as mitocôndrias envelhecem são destruídas por autofagia, um processo em que participam os lisossomas, envolvidos no controlo dos constituintes celulares (Terman and Brunk 2005). O número de mitocôndrias na célula não depende só da taxa de divisão mitocondrial mas também da taxa de degradação mitocondrial, pelo que a acumulação de mitocôndrias disfuncionais com o envelhecimento deve-se à diminuição da taxa de degradação mitocondrial (Van Remmen and Richardson 2001). Alterações na função cardíaca associadas à idade incluem a diminuição do número de cópias de mtDNA, a diminuição da concentração de mRNA dos genes que codificam proteínas mitocondriais, a redução da actividade enzimática oxidativa e a redução das taxas de síntese de proteínas mitocondriais (Nair, 2004).

3.Cadeia transportadora de electrões

Na maioria dos tecidos humanos, a mitocôndria providencia a energia necessária para o crescimento da célula e para as actividades biológicas. Estima-se que aproximadamente 90% do consumo de oxigénio nos mamíferos tem origem mitocondrial, que primariamente serve para sintetizar ATP, apesar de os níveis variarem de acordo com o tecido considerado e com o estado de actividade do organismo (Benard and Rossignol 2008).

As mitocôndrias intervêm na fase de catabolismo celular, segundo reacções enzimáticas do metabolismo que degradam hidratos de carbono, lípidos, proteínas em moléculas mais pequenas como piruvato, ácidos gordos e aminoácidos, respectivamente (Benard and Rossignol 2008). A mitocôndria transforma esses elementos energéticos em NADH e/ou FADH₂, através da β -oxidação e do ciclo de *Krebs* (Poyton and McEwen 1996; Benard and Rossignol 2008; Huttemann, Lee et al. 2008). Estes produtos

funcionam como doadores de electrões de elevada energia e são depois degradados pela cadeia transportadora de electrões num processo de conversão de energia vulgarmente designado de fosforilação oxidativa (OXPHOS), onde os electrões libertados pela oxidação do NADH e FADH_2 vão passar ao longo de uma série de transportadores agrupados sob o nome de cadeia transportadora de electrões e, finalmente, servir para reduzir o oxigénio em água (Benard and Rossignol 2008; Huttemann, Lee et al. 2008).

A ETC (Figuras 3 e 4) é um grupo de complexos oligoméricos localizados na membrana interna da mitocôndria. Quatro complexos enzimáticos de múltiplas subunidades polipeptídicas (complexos I a IV), juntamente com dois transportadores móveis de electrões, a ubiquinona (coenzima Q) e o citocromo c constituem a cadeia respiratória ou cadeia transportadora de electrões e são responsáveis pelo transporte de electrões e formação do gradiente protónico. O sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial é composto por estes complexos mais a ATP sintetase (complexo V), sendo responsável pela dissipação do gradiente de protões formado e síntese de ATP (Barrientos 2002; Liu, Fiskum et al. 2002; Cecchini 2003; Janssen, Nijtmans et al. 2006; Lesnefsky and Hoppel 2006; Navarro and Boveris 2007; Benard and Rossignol 2008; Huttemann, Lee et al. 2008).

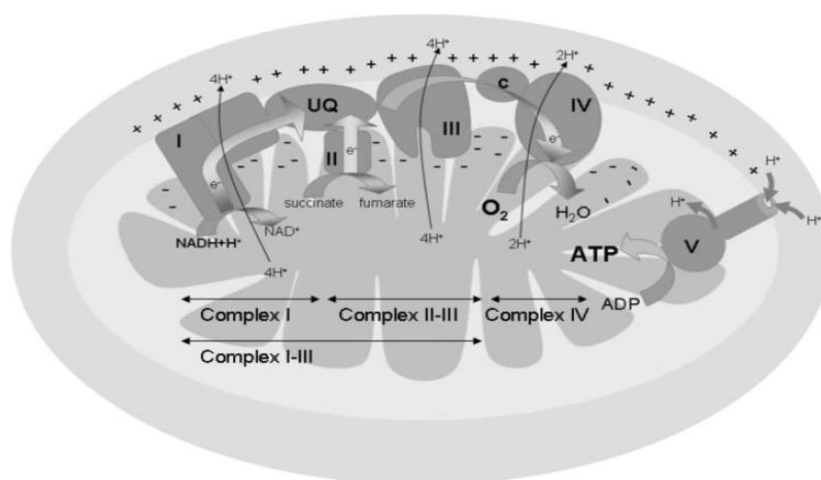


Figura 3: Representação esquemática da cadeia transportadora de electrões (Navarro and Boveris 2007).

3.1 Composição da cadeia transportadora de electrões

Os complexos enzimáticos da ETC contêm vários grupos prostéticos (FMN, FAD, FeS, Cu, Heme) ligados a proteínas, que funcionam como transportadores de electrões. Estes complexos são compostos por numerosas subunidades proteicas codificadas tanto por genes nucleares como pelo mtDNA com a excepção do complexo II, formado

somente a partir do DNA nuclear (Maechler 2002; Duchen 2004; Benard and Rossignol 2008).

O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase; NADH desidrogenase) é composto por um grande número de proteínas (46 polipeptídeos diferentes nos mamíferos) (Maechler 2002; Brandt 2006; Navarro and Boveris 2007; Vonck and Schafer 2009), dos quais 7 são codificados pelo mtDNA (ND1-ND6, ND4L) (Schulte 2001; Bianchi, Fato et al. 2003; Carreras, Franco et al. 2004; Janssen, Nijtmans et al. 2006; Zickermann, Droese et al. 2008; Sharma, Lu et al. 2009). Este é o maior complexo da ETC, com uma massa molecular de aproximadamente 1000kDa nas mitocôndrias de coração de cavalo (Cecchini 2003; Brandt 2006; Janssen, Nijtmans et al. 2006; Sharma, Lu et al. 2009; Vonck and Schafer 2009). Este complexo catalisa a oxidação do NADH a NAD^+ , transferindo dois electrões para a ubiquinona (transportador de electrões móvel, solúvel em lípidos) (Cecchini 2003; Janssen, Nijtmans et al. 2006; Lesnefsky and Hoppel 2006; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Petrosillo, Matera et al. 2009), através de uma série de centros redox que incluem a flavina mononucleotideo (FMN) e sete a nove centros ferro-enxofre (FeS), e até três espécies ubisemiquinona (Cecchini 2003; Brandt 2006; Janssen, Nijtmans et al. 2006). De forma acoplada com a reacção de oxiredução, o complexo I também catalisa o bombeamento de 4 protões da matriz para o espaço intermembranar (Brandt 2006; Janssen, Nijtmans et al. 2006; Navarro and Boveris 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Petrosillo, Matera et al. 2009). Este complexo apresenta uma estrutura em forma de “L”, com um braço longo com proteínas integrais de membrana hidrofóbicas e um braço curto que se estende até à matriz com domínio hidrofílico que contém a FMN e os centros activos de NADH (Brandt 2006; Navarro and Boveris 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Zickermann, Droese et al. 2008; Sharma, Lu et al. 2009). Estudos recentes com microscopia electrónica em que analisaram o complexo I de *Escherichia coli*, sugerem que a conformação nativa exhibe uma estrutura em forma de ferradura e que este complexo pode alterar a sua forma dependendo do seu estado redox (Cecchini 2003; Brandt 2006). No entanto, este resultado ainda não foi demonstrado em eucariotas (Brandt 2006).

O complexo II (succinato desidrogenase; succinato-ubiquinona oxidoreductase) reduz o succinato a fumarato, transferindo dois electrões para a ubiquinona. Este complexo não transporta protões através da membrana e não contribui para o gradiente de protões (Cecchini 2003). Tem a característica de ser o único complexo que faz simultaneamente parte da ETC e do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) (Cecchini 2003; Navarro and Boveris 2007). É constituído por apenas 4 péptidos, codificados por

genes nucleares, sendo o mais simples de todos os complexos da ETC (Maechler 2002; Cecchini 2003). As 4 subunidades são nomeadamente, uma flavina, ligada covalentemente ao cofactor dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), uma proteína Fe-S e dois péptidos pequenos e hidrofóbicos também chamados de âncora de membrana (Cecchini 2003). Este complexo não participa na translocação de prótons (Dudkina, Sunderhaus et al. 2008)

O complexo III (complexo citocromo bc₁; ubiquinol-citocromo c oxidoreductase) catalisa a transferência de electrões do ubiquinol para o citocromo c (Yu, Tian et al. 1999; Lesnefsky, Gudz et al. 2001; Petrosillo, Ruggiero et al. 2003; Lesnefsky and Hoppel 2006; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Solmaz and Hunte 2008) e participa na translocação de prótons da matriz para o citosol (Lesnefsky, Gudz et al. 2001; Petrosillo, Ruggiero et al. 2003; Lesnefsky and Hoppel 2006; Solmaz and Hunte 2008). A transferência de electrões é particularmente complexa, uma vez que o ubiquinol transporta dois electrões e o citocromo c só pode transportar um electrão (Petrosillo, Ruggiero et al. 2003). Nos mamíferos este complexo homodimérico de proteínas integrais de membrana possui a massa molecular de aproximadamente 500kDa (Solmaz and Hunte 2008). Cada monómero deste complexo possui uma massa molecular de 240kDa (Murphy 2009) e consiste em 9-10 subunidades (Navarro and Boveris 2007), 3 das quais associadas a centros redox (Lesnefsky, Gudz et al. 2001; Navarro and Boveris 2007). Estes centros são: citocromos b₅₆₆ (b_L) e b₅₆₂ (b_H), citocromo c₁ e os complexos ferro-enxofre (Yu, Tian et al. 1999; Cecchini 2003; Lesnefsky and Hoppel 2006; Navarro and Boveris 2007). O citocromo b é o único peptídeo deste complexo codificado pelo genoma mitocondrial, sendo as restantes subunidades codificadas pelo DNA nuclear. As subunidades VIII e X são subunidades de baixo peso molecular (9,2kDa e 7,4kDa, respectivamente) que juntamente com o citocromo c₁, contribuem para a ligação do citocromo c (Lesnefsky, Gudz et al. 2001).

O citocromo c é uma pequena proteína globular ligada a um grupo heme c, que transfere electrões do complexo III para o complexo IV (Banci, Bertini et al. 1999; Navarro and Boveris 2007).

O complexo IV (citocromo c oxidase, citocromo oxidase, citocromo c-O₂ oxidoreductase) é o aceitador final de electrões da cadeia respiratória. Este complexo recebe electrões do citocromo c e transfere-os para a molécula de oxigénio, reduzindo-a a H₂O (Barrientos 2002; Diaz, Fukui et al. 2006; Hosler, Ferguson-Miller et al. 2006; Navarro and Boveris 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Fontanesi, Soto et al. 2008). Para efectuar esta transferência, o complexo IV possui quatro centros metálicos redox,

Cu_A , heme a, heme a_3 e Cu_B (Cecchini 2003; Diaz, Fukui et al. 2006; Fontanesi, Soto et al. 2008). Além da transferência de electrões e bombeamento de protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, o complexo IV também contribui para o gradiente electroquímico que irá ser usado na fosforilação oxidativa para a síntese de ATP (Fontanesi, Soto et al. 2008). Nos mamíferos este complexo de 200kDa (Diaz, Fukui et al. 2006) é composto por 13 subunidades diferentes, 3 das quais são codificadas pelo genoma mitocondrial (Barrientos 2002; Cecchini 2003; Diaz, Fukui et al. 2006; Fontanesi, Soto et al. 2008).

3.2 Fluxo de electrões ao longo da cadeia respiratória

Operacionalmente, o ponto-chave para o fluxo de electrões é a transferência de energia entre os intermediários da cadeia transportadora de electrões movendo-se progressivamente e energeticamente do estado reduzido para o estado oxidado (Duchen 2004). Os principais dadores de electrões podem ser tanto o NADH como o FADH_2 (succinato), originando duas vias diferentes (Figura 4) (Duchen 2004; Lesnefsky and Hoppel 2006; Benard and Rossignol 2008). Quando o NADH é o dador de electrões, os electrões são transferidos para o complexo I nomeadamente para o FMN onde o NADH é reduzido a NAD^+ . Seguidamente, o fluxo de electrões passa por uma série de oito complexos de ferro-enzofre até chegar à ubiquinona que é reduzida a ubiquinol quando estes são transferidos para o complexo III. Se o dador de electrões é o succinato, a cadeia começa no complexo II. Através deste percurso o succinato produzido durante o ciclo de *Krebs* é reduzido a fumarato pela transferência de dois electrões para a FAD no complexo II. Da mesma forma que na via do NADH, o fluxo de electrões a partir da FAD para a ubiquinona dá-se através de três complexos de ferro-enzofre. A partir desta etapa, as duas vias seguem o mesmo percurso. O complexo III transfere um par de electrões do ubiquinol para duas moléculas de citocromo c. O citocromo c, por sua vez, transfere os electrões para o complexo IV, que é o aceitador final de electrões da cadeia respiratória, onde uma molécula de O_2 é reduzida a duas moléculas de H_2O (Duchen 2004).

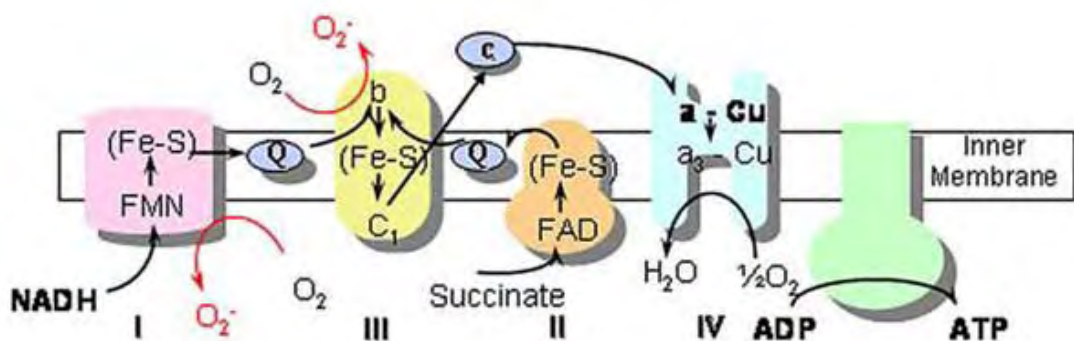


Figura 4: Fluxo de electrões ao longo dos complexos da cadeia respiratória (Duchen 2004).

O transporte de electrões da cadeia respiratória está associado ao bombeamento de prótons nos complexos I, III e IV, através da membrana interna para o espaço intermembranar, criando um gradiente electroquímico (Duchen 2004; Lesnefsky and Hoppel 2006; Boekema and Braun 2007; Navarro and Boveris 2007; Benard and Rossignol 2008; Figueiredo, Mota et al. 2008; Huttemann, Lee et al. 2008), que é utilizado pelo F1-F0 ATPase (ou ATP sintetase; complexo V) para fosforilar a adenosina difosfato ADP e, assim, produzir adenosina trifosfato (ATP) (Duchen 2004; Lesnefsky and Hoppel 2006; Benard and Rossignol 2008; Huttemann, Lee et al. 2008). Este gradiente é composto por dois componentes: um potencial eléctrico e um potencial químico que podem ser expressos em gradiente de pH (Benard and Rossignol 2008).

A maioria do ATP celular, nos eucariotas, é sintetizada pelo complexo F1-F0-ATPase na membrana interna mitocondrial durante a fosforilação oxidativa (Navarro and Boveris 2007; Fontanesi, Soto et al. 2008). A ATP sintetase ou F1-F0-ATPase mitocondrial é constituída por 10-15 subunidades distintas e possui uma massa molecular de aproximadamente 600kDa (Vonck and Schafer 2009). A ATP sintetase é composta por duas porções proteicas acopladas, funcionalmente e fisicamente distintas: a F0, proteína de membrana integral que é hidrofóbica e a F1, proteína de membrana periférica (Weber 2006; Navarro and Boveris 2007; Fontanesi, Soto et al. 2008).

Em condições fisiológicas, a produção de energia mitocondrial pode alternar entre dois estados de energia: basicamente, o estado 4, caracterizado por uma respiração lenta e em que há baixa produção de ATP (potencial eléctrico elevado) enquanto que o estado 3 é caracterizado por uma respiração rápida com elevada produção de ATP (potencial eléctrico baixo) (Benard and Rossignol 2008).

3.3 Organização da cadeia respiratória

A organização dos complexos da OXPHOS foi descrita, durante muito tempo, pelo modelo fluído (Figura 5a), que postula que estes complexos se difundem livremente na membrana independentemente de outros complexos e em que a transferência de electrões entre os complexos se baseia na difusão acoplada com colisões aleatórias (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Boekema and Braun 2007; Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Genova, Baracca et al. 2008; Stuart 2008; Schon and Dencher 2009). Ainda segundo esta organização estrutural, os transportadores móveis de electrões, ubiquinona e citocromo c, apresentam taxas de difusão relativamente maiores em relação aos complexos integrados na membrana (Stuart 2008; Schon and Dencher 2009). Este modelo baseia-se na

constatação de que todas as proteínas do sistema de OXPHOS podem ser purificadas na forma fisiologicamente activa (Schagger and Pfeiffer 2000; Boekema and Braun 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008).

Mais recentemente, Schagger *et al.* (1994; 2000; 2001; 2002; 2004) encontraram evidências estruturais, utilizando a técnica de BN-PAGE (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), de associações específicas dos complexos OXPHOS de mitocôndrias de mamíferos, demonstrando que estes complexos podem reunir-se em estruturas supramoleculares chamadas supercomplexos ou respirassomas. Esta organização dinâmica dos complexos da OXPHOS mitocondrial em supercomplexos tem sido descrita para outros organismos, incluindo fungos, bactérias e plantas (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Schagger 2002; Dudkina, Heinemeyer et al. 2006; Boekema and Braun 2007; Stuart 2008; Vonck and Schafer 2009). São várias as evidências que apontam para a estabilização das interações dos complexos da OXPHOS em supercomplexos (Figura 5b), (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Schagger 2002; Boekema and Braun 2007; Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008; Vonck and Schafer 2009) como por exemplo: i) procedimentos de isolamento dos complexos da OXPHOS resultam na co-purificação de mais do que uma oxidoreductase (Boekema and Braun 2007); ii) mutações pontuais nos genes que codificam subunidades de um complexo da OXPHOS parecem afectar a estabilidade dos outros complexos (Boekema and Braun 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008); iii) os supercomplexos podem ser separados por BN-PAGE e a sua actividade avaliada por coloração histoquímica específica para cada complexo (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Schagger 2002; Schagger, de Coo et al. 2004); iv) a análise por microscopia electrónica sugeriu a existência de associações de complexos OXPHOS bem definida (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Bianchi, Fato et al. 2003; Boekema and Braun 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008).

Os supercomplexos descritos predominantemente envolvem os complexos I, III e IV e formas diméricas/oligoméricas de ATP sintetase (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Schagger 2002; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Stuart 2008). Estes dímeros de ATP sintetase parecem condicionar a estrutura das cristas mitocondriais e, eventualmente, a organização de outros supercomplexos da OXPHOS (Boekema and Braun 2007). Várias associações de supercomplexos têm sido identificadas: i) dímeros de ATP sintetase; ii) supercomplexo I-III₂, incluindo o complexo I e um dímero do complexo III; iii) supercomplexo III₂-IV₁₋₂, consistindo em dímeros de complexos III e uma ou duas cópias de monómeros de complexo IV; iv) supercomplexo I-III₂-IV₁₋₄, compreendendo o

complexo I, dímeros de complexo III e uma a quatro cópias de monómeros do complexo IV, também chamado de respirassoma (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2002; Wittig, Carrozzo et al. 2006; Schafer, Dencher et al. 2007; Stuart 2008) porque transporta electrões do NADH para reduzir o oxigénio (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). A organização do complexo I no supercomplexo I-III-IV parece ser importante para a estabilidade do sistema membranar mitocondrial (Schagger, de Coo et al. 2004). O complexo II nunca foi observado como fazendo parte de um supercomplexo quando analisado por BN-PAGE ou por microscopia electrónica (Schagger and Pfeiffer 2000; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008). No entanto, existem indicações de que os complexos do sistema de OXPHOS não estão sempre organizados em supercomplexos. Isto pode ser deduzido, simplesmente, por existirem diferentes concentrações de cada complexo OXPHOS na membrana interna mitocondrial. Deste modo, os supercomplexos e os complexos OXPHOS individuais coexistem na membrana interna mitocondrial (Boekema and Braun 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008) (Figura 5c). A associação de complexos OXPHOS em supercomplexos e a dissociação de supercomplexos é considerado um processo dinâmico, que depende do tipo de célula (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008) e do estado fisiológico desta (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008).

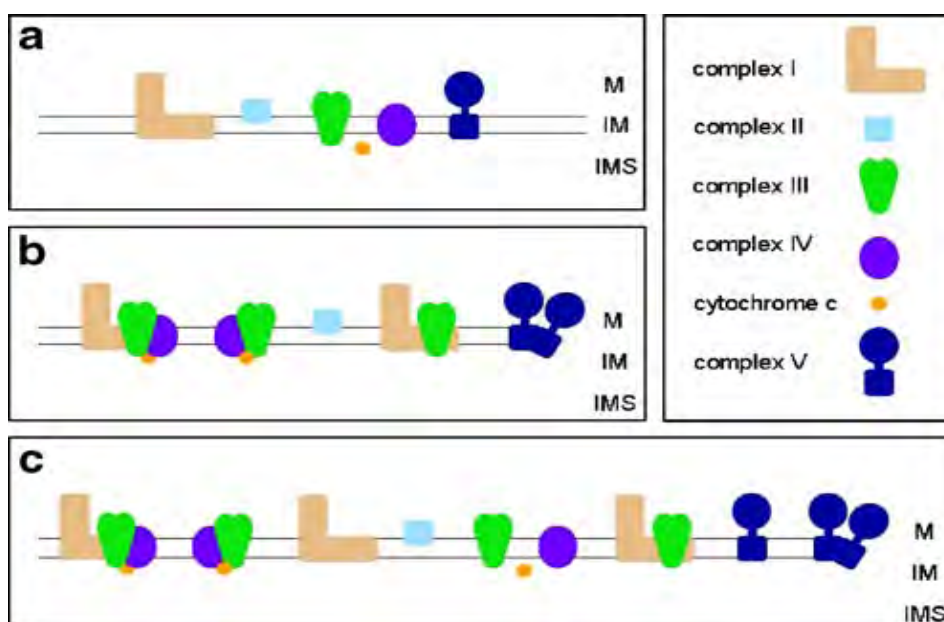


Figura 5: Representação dos modelos propostos de organização do sistema de OXPHOS mitocondrial. **a.** o “modelo do estado líquido”. **b.** o “modelo do estado sólido” definindo as interações dos complexos em supercomplexos. **c.** Modelo integrado do sistema de OXPHOS.

M-Matriz, IM-Membrana interna mitocondrial, IMS-Espaço intermembranar mitocondrial (Dudkina, Sunderhaus et al. 2008).

Recentemente, Acín-Pérez *et al.* (2008) não só confirmaram a presença de diferentes formas de supercomplexos em mitocôndrias de fígado de rato, como previamente observado por outros investigadores mas também demonstraram, pela primeira vez, a existência de supercomplexos contendo o complexo II e a ATP sintetase. No geral, estes autores observaram os diferentes supercomplexos: I-II-III-IV, I-III-IV, I-III-V, II-III-IV. Para além disso, constataram que alguns supercomplexos contêm Coenzima Q e citocromo c e propuseram um modelo de organização estrutural da cadeia respiratória mitocondrial – modelo da plasticidade (Figura 6). Este modelo propõe a coexistência de complexos individuais com supercomplexos, em que a sua composição varia de acordo com as necessidades bioenergéticas (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). Estas observações sugerem que a organização da membrana interna mitocondrial cria uma plataforma para a coordenação do transporte de electrões com a ATP sintetase (Rosca and Hoppel 2009).

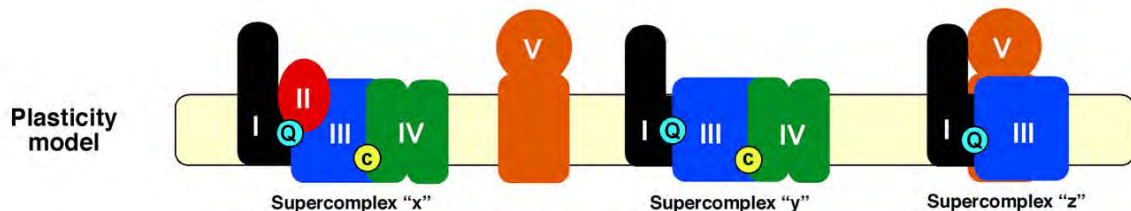


Figura 6: Modelo da plasticidade da organização do sistema OXPHOS mitocondrial proposto por Acín-Pérez *et al.* (2008). Para simplificar todos os componentes estão representados como monómeros. I-V – complexos I-V; Q- Coenzima Q, C- citocromo c (Schon and Dencher 2009).

A função do citocromo c no agrupamento dos complexos do sistema OXPHOS nos mamíferos não tem sido muito explorada. Vempati *et al.* (2009) verificaram que tanto a função como a presença física do citocromo c são necessárias para a estabilidade e organização dos complexos da cadeia respiratória. Na sequência das observações de que o citocromo c faz parte do respirassoma (complexo I-III-IV) e que está associado com o complexo IV (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008), Vempati *et al.* (2009) verificaram também que a falta de citocromo c resulta na diminuição da actividade do complexo IV, pelo que o citocromo c parece ser necessário para a estabilidade deste complexo. Estudos de outros grupos (Diaz, Fukui et al. 2006; Li, D'Aurelio et al. 2007) têm sugerido que o complexo I não é estável na ausência do complexo IV. Resultados semelhantes foram observados quando o complexo III está ausente (Schagger, de Coo et al. 2004). A formação do respirassoma depende não só dos complexos do sistema de OXPHOS mas também da função estrutural do citocromo c (Vempati, Han et al. 2009).

A organização supramolecular do sistema de OXPHOS é considerada de grande importância funcional quando comparada com os complexos individuais (Schagger 2001).

Efectivamente, os supercomplexos da cadeia respiratória podem: i) permitir um aumento da taxa de transferência de electrões (*“channeling”* de electrões) assegurando que os complexos e os transportadores móveis de electrões (ubiquinona e citocromo c) estão mais próximos (Boekema and Braun 2007; Schafer, Dencher et al. 2007), aumentando a velocidade das reacções (Schagger 2001); ii) *“Channeling”* de substrato, quinona e citocromo c, não se sabendo, no entanto, se a taxa de transferência de electrões aumenta pela diminuição da distância de difusão dos substratos ou por *“channeling”* do substrato específico (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001); iii) determinar a ultraestrutura da membrana interna mitocondrial (Boekema and Braun 2007); iv) aumentar a estabilidade dos complexos OXPHOS (Schagger 2001; Boekema and Braun 2007; Schafer, Dencher et al. 2007); v) aumentar a capacidade de inserção de proteínas na membrana interna mitocondrial (Boekema and Braun 2007); vi) permitir o sequestro de intermediários reactivos como a ubisemiquinona que podem reagir com o oxigénio para gerar o anião superóxido (Schagger and Pfeiffer 2000; Schagger 2001; Schagger 2002; Schagger, de Coo et al. 2004) e vii) minimizar a geração de espécies reactivas potencialmente tóxicas (Schon and Dencher 2009).

Os supercomplexos podem ser isolados a partir da membrana interna mitocondrial usando detergentes não iónicos moderados, como a digitonina. Os métodos mais utilizados para caracterizar bioquimicamente os supercomplexos são o BN-PAGE, o CN-PAGE (*clear-native polyacrylamide gel electrophoresis*) e a centrifugação com gradiente de densidade. Para determinar a composição dos supercomplexos é utilizado o 2D-BN-PAGE em que a constituição dos complexos separados por BN-PAGE é posteriormente avaliada por SDS-PAGE (Vonck and Schafer 2009). Existem muitas evidências experimentais que suportam a existência de supercomplexos, no entanto, estas evidências não são totalmente conclusivas, pelo que a organização dos complexos da cadeia respiratória é ainda alvo de grande controvérsia.

4. Stress oxidativo mitocondrial

4.1 Mitocôndria – Produção de espécies reactivas

No decorrer da actividade respiratória pode ocorrer a fuga de electrões (Valko, Rhodes et al. 2006; Chakravarti and Chakravarti 2007; Jung, Bader et al. 2007; Angelopoulou, Lavranos et al. 2009) que podem reduzir o oxigénio formando uma espécie radical livre altamente reactiva, o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Ott, Gogvadze et al. 2007; Hoye, Davoren et al. 2008; Trifunovic and Larsson 2008), que por sua vez pode ainda ser reduzido a radical hidróxilo (HO^{\cdot}) e a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Hoye,

Davoren et al. 2008; Trifunovic and Larsson 2008). Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ pode iniciar a redução do óxido nítrico (NO^{\cdot}), resultando na produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Trifunovic and Larsson 2008). O termo espécies reactivas de oxigénio (ROS) é usado para descrever uma variedade de moléculas ou radicais livres (espécies químicas com um electrão desemparelhado) derivadas do oxigénio molecular (Turrens 2003; Jezek and Hlavata 2005). À semelhança, as espécies reactivas de azoto (RNS) incluem espécies de radicais livres derivadas do óxido nítrico (Turrens 2003; Jezek and Hlavata 2005).

A mitocôndria é, assim, a principal fonte celular de ROS, subprodutos da actividade da cadeia respiratória (Leeuwenburgh and Heinecke 2001; Chen, Vazquez et al. 2003; Turrens 2003; Brookes, Yoon et al. 2004; Duchon 2004; Brookes 2005; Ott, Gogvadze et al. 2007; Benard and Rossignol 2008; Gustafsson and Gottlieb 2008; Trifunovic and Larsson 2008; Angelopoulou, Lavranos et al. 2009; Huang and Hood 2009; Murphy 2009; Stowe 2009). Cerca de 90% do oxigénio da célula é consumido na cadeia respiratória mitocondrial, sendo 1-5% desse oxigénio molecular convertido em $O_2^{\cdot-}$, principal ROS produzido na mitocôndria (Duchon 2004; Ott, Gogvadze et al. 2007; Foster, Van Eyk et al. 2009; Stowe 2009), mesmo durante o estado fisiológico normal (Leeuwenburgh and Heinecke 2001; Figueiredo, Mota et al. 2008). Na presença de iões metálicos livres, como o Fe^{2+} e o Cu^+ , o H_2O_2 pode originar um radical altamente reactivo, o radical HO^{\cdot} , pela reacção de Fenton (Kirkinezos and Moraes 2001; Szeto 2006; Valko, Rhodes et al. 2006; Ott, Gogvadze et al. 2007; Figueiredo, Mota et al. 2008; Trifunovic and Larsson 2008; Foster, Van Eyk et al. 2009; Stowe 2009).

Os complexos I e III são considerados os principais locais de produção de $O_2^{\cdot-}$ (Kirkinezos and Moraes 2001; St-Pierre, Buckingham et al. 2002; Chen, Vazquez et al. 2003; Jezek and Hlavata 2005; Benard and Rossignol 2008; Figueiredo, Mota et al. 2008; Foster, Van Eyk et al. 2009; Murphy 2009; Sharma, Lu et al. 2009; Stowe 2009). A contribuição relativa de cada local para a produção global de $O_2^{\cdot-}$ varia de órgão para órgão (Barja 1999; Dufour and Larsson 2004) e também depende se as mitocôndrias se encontram no estado de respiração activo (estado 3) ou no estado de respiração reduzido (estado 4) (Barja 1999), sendo maior a produção de ROS no estado 4 (Trifunovic and Larsson 2008). Apesar de o complexo III parecer responsável pela maior produção de $O_2^{\cdot-}$ nas mitocôndrias de coração (Turrens 2003; Brookes, Yoon et al. 2004; Foster, Van Eyk et al. 2009) e pulmão, no cérebro o complexo I parece ser a principal fonte de $O_2^{\cdot-}$ em condições fisiologicamente normais (Turrens 2003). Acredita-se que o radical ubisemiquinona (QH^{\cdot}) do “Ciclo Q” no complexo III seja o principal local de produção de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial sendo libertado maioritariamente para o espaço intermembranar

(Petrosillo, Ruggiero et al. 2003; Brookes 2005; Jezek and Hlavata 2005; Benard and Rossignol 2008; Foster, Van Eyk et al. 2009) onde é reduzido a H_2O_2 pela cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) (Foster, Van Eyk et al. 2009). Algum $\text{O}_2^{\cdot-}$ mitocondrial também é libertado para a matriz mitocondrial (St-Pierre, Buckingham et al. 2002; Turrens 2003; Foster, Van Eyk et al. 2009) onde é convertido em H_2O_2 pela manganês superóxido dismutase (MnSOD) (Foster, Van Eyk et al. 2009). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ formado ao nível do complexo I (Turrens 2003; Brookes 2005; Grivennikova and Vinogradov 2006; Zickermann, Droese et al. 2008) é libertado para a matriz onde é reduzido pela MnSOD, apesar de o local exacto onde o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é produzido no complexo I permanecer por esclarecer (Kushnareva, Murphy et al. 2002; Turrens 2003). A FMN, os vários centros de Fe-S e local de ligação da ubiquinona têm sido propostos como potenciais fontes de ROS (Turrens 2003; Brookes 2005; Stowe 2009) (Figura 7). A produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo complexo I pode também ser estimulada pela presença de succinato, o substrato do complexo II (Liu, Fiskum et al. 2002). O H_2O_2 é rapidamente reduzido a H_2O pelas enzimas glutathione peroxidase, peroxiredoxinas e catalase (Foster, Van Eyk et al. 2009). O complexo III tem sido descrito como o local dominante de produção de ROS (Chen, Vazquez et al. 2003; Choksi and Papaconstantinou 2008) porque estas são libertadas para longe do sistema de defesa antioxidante da matriz mitocondrial. Ao contrário, o complexo I liberta oxidantes para as proximidades do sistema de defesa enzimático mitocondrial (Chen, Vazquez et al. 2003), pelo que as ROS são mais facilmente neutralizadas.

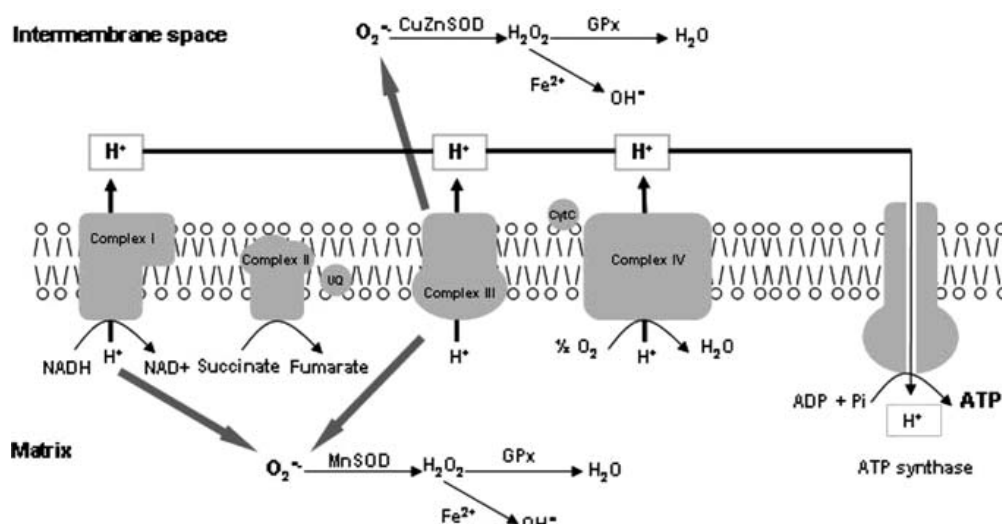


Figura 7: Locais de produção de ROS na cadeia respiratória mitocondrial (Figueiredo, Mota et al. 2008).

O NO^{\cdot} é um radical reactivo abundante que actua como uma importante molécula de sinalização biológica oxidativa numa grande variedade de processos biológicos,

incluindo a neurotransmissão, a regulação da pressão sanguínea, os mecanismos de defesa imune, a apoptose (Giuffre, Barone et al. 2000; Valko, Rhodes et al. 2006) e a vasodilatação (Davidson and Duchon 2006). No coração e sistema cardiovascular, o NO[•] parece ter um papel central na regulação da contracção cardíaca, consumo de oxigénio, apoptose e hipertrofia (Davidson and Duchon 2006). Este radical é gerado pelos tecidos biológicos por acção da óxido nítrico sintetase (NOS), que metaboliza a arginina a citrulina com formação de NO[•] (Brookes, Levonen et al. 2002; Turko and Murad 2002; Giulivi 2003; Elfering, Haynes et al. 2004; Nisoli and Carruba 2006; Valko, Rhodes et al. 2006). Nos mamíferos existem três isoformas da NOS que são expressas constitutivamente em determinados tecidos: NOS neuronal (nNOS, 160kDa), NOS induzível (iNOS, 135kDa) e NOS endotelial (eNOS, 149kDa) (Valdez, Zaobornyj et al. 2004). Tanto o nNOS e eNOS estão presentes nos cardiomiócitos humanos normais (Davidson and Duchon 2006). No entanto, a expressão do iNOS aparece nos cardiomiócitos disfuncionais (Turko and Murad 2002; Davidson and Duchon 2006), levando a falência cardíaca, dilatação cardíaca, o que contribui para o fenótipo cardíaco dos indivíduos mais velhos (Kanski, Behring et al. 2005). Além disso, uma isoforma mitocondrial da NOS (mtNOS) tem sido descrita como uma proteína constitutiva da membrana interna mitocondrial que também gera NO[•] (Ghafourifar, Schenk et al. 1999; Turko and Murad 2002; Giulivi 2003; Elfering, Haynes et al. 2004; Valdez, Zaobornyj et al. 2004; Ghafourifar and Cadenas 2005; Davidson and Duchon 2006). Este NO[•] interage com a cadeia respiratória de várias formas: i) causando a inibição reversível do complexo IV (Giuffre, Barone et al. 2000; Brookes, Levonen et al. 2002; Jezek and Hlavata 2005; Brown and Borutaite 2007); ii) reagindo com o O₂^{•-} para produzir ONOO⁻ podendo causar a inibição irreversível da respiração mitocondrial por reacções de oxidação. O ONOO⁻ inibe ou provoca danos nos complexos I, II e V e outros componentes mitocondriais (Brown 2001; Ghafourifar and Cadenas 2005; Brown and Borutaite 2007). A actividade da mtNOS, como enzima integral da membrana interna mitocondrial, diminui significativamente com o envelhecimento no fígado, cérebro (Navarro and Boveris 2004) e coração de ratos (Valdez, Zaobornyj et al. 2004).

A descoberta que a mitocôndria produz NO[•] tem implicações na produção de oxidantes e na função mitocondrial. Em quantidades moderadas, o NO[•] pode actuar como regulador da respiração mitocondrial (Leeuwenburgh and Heinecke 2001) e em concentrações elevadas reage directamente com o oxigénio podendo resultar na nitração (adição de um grupo NO²⁺), nitrosação (adição de um grupo NO⁺) ou nitrosilação (adição de um grupo NO) de biomoléculas (Davidson and Duchon 2006), sendo tóxico para os sistemas biológicos (Valko, Rhodes et al. 2006). Efectivamente, várias evidências

apontam para este papel duplo das espécies reactivas de oxigénio/azoto (RONS) que actuam tanto no metabolismo celular e de sinalização (Jackson, Papa et al. 2002) como, quando em concentrações mais elevadas, podem causar danos nos componentes celulares (proteínas, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos) (Jezek and Hlavata 2005; Benard and Rossignol 2008; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008).

As mitocôndrias não representam apenas o principal local de produção de ROS, mas são também o principal alvo de danos induzidos pelas ROS (Duchen 2004; Ott, Gogvadze et al. 2007; Trifunovic and Larsson 2008). Devido à proximidade da cadeia respiratória mitocondrial ao mtDNA, a produção de ROS pode resultar num ciclo vicioso de danos oxidativos, causando alterações progressivas no mtDNA e na função mitocondrial, que leva, por sua vez, à privação de energia, desequilíbrio redox e à disfunção celular (Ott, Gogvadze et al. 2007; Benard and Rossignol 2008; Angelopoulou, Lavranos et al. 2009). A taxa de produção de ROS aumenta em resposta a uma variedade de condições patológicas incluindo hipoxia, isquemia, reperfusão, envelhecimento e inibição química da respiração mitocondrial (Hoye, Davoren et al. 2008). De acordo com a teoria mitocondrial do envelhecimento, a produção de ROS provoca danos nas biomoléculas, levando à disfunção mitocondrial e consequente aumento da produção de ROS. Este ciclo vicioso causa um aumento exponencial de mutações no mtDNA ao longo do tempo, resultando em envelhecimento e doenças degenerativas associadas (Benard and Rossignol 2008). Acredita-se que a produção mitocondrial de ROS é a principal causa de danos celulares que acumulados ao longo do tempo podem ser responsáveis pelo envelhecimento (Liu, Fiskum et al. 2002; Sastre, Pallardo et al. 2003; Duchen 2004). Tem sido sugerido que a produção de RONS está aumentada em mitocôndrias de tecidos envelhecidos devido a uma diminuição do fluxo de electrões ao longo da cadeia respiratória mitocondrial e a uma diminuição da actividade dos complexos da cadeia respiratória principalmente os complexos I e III, aumentando a libertação de electrões para a geração de ROS (Lesnefsky and Hoppel 2006). Para proteger a célula do stress oxidativo, a mitocôndria possui um sistema de defesa antioxidante e de reparação dos danos induzidos pelas ROS (Ott, Gogvadze et al. 2007).

4.2 Mitocôndria – Sistema antioxidante

Embora as ROS sejam produzidas em quantidades consideráveis pelas reacções metabólicas diárias, os seus efeitos só são visíveis em condições clínicas específicas e, geralmente, após um período de acumulação de microlesões ao longo do tempo. Assim,

em condições fisiológicas o organismo tem capacidade para minimizar os danos induzidos pelas ROS através de uma série de medidas defensivas- sistema antioxidante. O sistema antioxidante protege as células e estruturas celulares de duas formas, impedindo a oxidação pela limitação do contacto das ROS com moléculas da célula sensíveis ou pela aceleração da destruição dos produtos oxidados, antes que provoquem distúrbios internos (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009).

A primeira categoria inclui estruturas membranares, enzimas e vitaminas. As membranas em torno dos componentes celulares e dos distintos organelos são uma importante medida de defesa. A dupla camada lipídica é resistente a uma série de irritantes exógenos, uma vez que o dano em qualquer local pode ser substituído por uma redistribuição dos lípidos vizinhos. Além disso, as membranas dos organelos permitem a compartimentalização da célula, o que na prática limita a possibilidade de acção das ROS em grande escala (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009). As enzimas antioxidantes são necessárias para a sobrevivência da célula. Estas incluem a superoxidase dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases, das quais a glutathione peroxidase (GPx) é a mais comum. A SOD é uma metaloenzima que cataliza a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Turrens 2003; Niess and Simon 2007; Hoyer, Davoren et al. 2008). Nos mamíferos existem isoenzimas de SOD que podem ser caracterizadas de acordo com o seu íon metálico e localização celular (Niess and Simon 2007). A matriz mitocondrial contém uma forma específica de SOD, a MnSOD, que elimina o $O_2^{\cdot-}$ da matriz mitocondrial convertendo-o em H_2O_2 (Yamakura, Taka et al. 1998; Leeuwenburgh and Heinecke 2001; Radi, Cassina et al. 2002; Turrens 2003; Andreyev, Kushnareva et al. 2005; Ascensao, Magalhaes et al. 2005; Jezek and Hlavata 2005; Cecarini, Gee et al. 2007; Niess and Simon 2007; Hoyer, Davoren et al. 2008). No citosol existe também uma forma específica de SOD, a CuZnSOD (Yamakura, Taka et al. 1998; Leeuwenburgh and Heinecke 2001; Radi, Cassina et al. 2002; Turrens 2003; Jezek and Hlavata 2005; Cecarini, Gee et al. 2007; Niess and Simon 2007), que também se encontra no espaço intermembranar mitocondrial contribuindo para controlar a concentração de $O_2^{\cdot-}$ (Turrens 2003). A CAT é a principal enzima responsável pela catalização do H_2O_2 a H_2O (Turrens 2003; Andreyev, Kushnareva et al. 2005; Niess and Simon 2007) e encontra-se principalmente nos peroxissomas da maioria das células dos mamíferos, mas as mitocôndrias e outros organelos intracelulares, como o retículo endoplasmático, também contêm esta enzima (Turrens 2003; Niess and Simon 2007). A GPx é provavelmente a enzima antioxidante mitocondrial melhor estudada e exerce um importante papel na decomposição do H_2O_2 mitocondrial. A GPx é uma enzima selénio dependente e encontra-se no núcleo,

mitocôndria e citosol das células (Radi, Cassina et al. 2002; Turrens 2003; Andreyev, Kushnareva et al. 2005; Benard and Rossignol 2008; Angelopoulou, Lavranos et al. 2009). Em animais de laboratório, a actividade desta enzima é reduzida pelo envelhecimento, levando a um aumento significativo da susceptibilidade à toxicidade mediada por ROS. No que diz respeito ao anião $O_2^{\cdot-}$, este é removido pela combinação de ambas as dismutases e as duas enzimas discutidas anteriormente (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009). Um sistema eficiente capaz de neutralizar o $O_2^{\cdot-}$ é o citocromo c (Turrens 2003). O espaço intermembranar também contém citocromo c (aproximadamente 1mM) (Radi, Cassina et al. 2002; Batthyany, Souza et al. 2005; Abriata, Cassina et al. 2009) que pode ser reduzido pelo $O_2^{\cdot-}$ (Turrens 2003; Zhao, Wang et al. 2003; Andreyev, Kushnareva et al. 2005; Starkov 2008), tendo, por isso um papel de neutralização das ROS (Turrens 2003). As vitaminas antioxidantes fazem parte de uma dieta saudável e incluem principalmente a vitamina C e E. A vitamina E está directamente relacionada com a neutralização de ROS, enquanto que a vitamina C é necessária para a reciclagem da vitamina E, pois esta última é oxidada temporariamente após cada utilização. Na mesma categoria pode incluir-se um mineral antioxidante, o selénio. Embora o seu mecanismo de acção ainda não esteja bem estabelecido, parece promover a acção antioxidante da vitamina E (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009).

A segunda linha de defesa inclui enzimas e complexos proteicos que removem os produtos oxidados. Este processo é necessário para a sobrevivência da célula, pois remove os restos das macromoléculas disfuncionais diminuindo a sua acumulação e favorecendo uma actividade celular normal (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009). As enzimas desta categoria incluem a glutaredoxina e a tioredoxina. Estas enzimas bloqueiam as proteínas oxidadas, dificultando a sua interacção com o conteúdo celular e conduzindo-as para a destruição proteolítica (lisossomas) ou, eventualmente, facilitando a sua exteriorização a partir do ambiente intracelular. Se este processo é competente ou não, e em que medida é que contribui para a resistência à acção dos ROS, ainda é controverso. Finalmente, outro mecanismo é a capacidade da célula para marcar a proteína oxidada com uma proteína *chaperone* designada por ubiquitina. Este processo (ubiquitinização) é seguido pela transferência da proteína ubiquitinada para complexos especializados chamados proteossomas, que medeiam a clivagem proteolítica independente de lisossomas (Angelopoulou, Lavranos et al. 2009).

Os sistemas antioxidantes referidos actuam como contramedida à exposição constante a ROS a que as mitocôndrias estão sujeitas em consequência da sua função biológica (Turrens 2003; Jezek and Hlavata 2005).

5. Modificações pós-traducionais das proteínas

As modificações pós-traducionais (PTMs) ocorrem nas proteínas recém sintetizadas e são comuns nos eucariotas (DiMarco and Giulivi 2007), muitas das quais condicionam o funcionamento das células. Foram já descritas mais de 300 PTMs (Witze, Old et al. 2007), sendo alguns exemplos: acetilações, nitrosilações, metilações e hidroxilações (Distler, Kerner et al. 2007; Witze, Old et al. 2007).

As oxidações das proteínas são uma consequência natural da vida aeróbia e têm sido discutidas como mecanismos de regulação na sinalização celular induzidos pelo stress oxidativo (Stadtman and Levine 2003; Viappiani and Schulz 2006; Chung, Miranda et al. 2008). Porque as proteínas têm muitas funções biológicas diferentes e únicas, as modificações oxidativas podem ter diversas consequências funcionais (Shacter 2000; Chakravarti and Chakravarti 2007). A oxidação de proteínas tem também um papel crucial reconhecido na etiologia e patofisiologia de algumas doenças (Stadtman and Levine 2003; Viappiani and Schulz 2006; Chung, Miranda et al. 2008) como desordens neurodegenerativas, inflamação, isquemia, diabetes, osteoartrite e no processo de envelhecimento (Requena, Levine et al. 2003; Murray, Oquendo et al. 2008) constituindo um bom marcador do envelhecimento dos sistemas biológicos (Stadtman 2002).

As modificações oxidativas das proteínas podem variar desde simples oxidações dos resíduos de cisteína a alterações causadas por níveis elevados de stress oxidativo, resultando no *crosslink* com outras proteínas (quer através de ligações S-S ou pela ligação cruzada entre 2-2 bifenil e dois radicais tirosil), na formação de agregados não covalentes ou mesmo na formação de aductos de proteínas com lípidos, hidratos de carbono, ou radicais de ácidos nucleicos (Viappiani and Schulz 2006). Existem numerosos tipos de modificações oxidativas das proteínas, mas não existe um marcador universal da oxidação de proteínas (Dalle-Donne, Rossi et al. 2003).

As modificações oxidativas das proteínas podem ser divididas em dois grupos diferentes: específicas e globais. No caso das oxidações específicas das proteínas, os resíduos de aminoácidos são especificamente oxidados (por exemplo: oxidação da tirosina a ditirosina, oxidação da fenilalanina a o-tirosina; a oxidação da metionina a metionina sulfóxido) (Levine 2002; Chakravarti and Chakravarti 2007). Os dois aminoácidos mais susceptíveis à oxidação são provavelmente a cisteína e a metionina, que contêm átomos de enxofre (Shacter 2000). A oxidação dos grupos sulfidrílicos com formação de ligações dissulfureto tem sido usada como um indicador do estado de oxidação das proteínas (Levine 2002; Chakravarti and Chakravarti 2007). As oxidações globais das proteínas originam a oxidação de uma variedade de resíduos de

aminoácidos, levando à formação de uma grande variedade de produtos, como por exemplo os grupos carbonilo. A carbonilação de proteínas pode ocorrer devido à oxidação directa da cadeia lateral de aminoácidos, onde os resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina são particularmente sensíveis à oxidação catalizada por metais, levando cada caso à formação de carbonilos derivados (Shacter 2000; Squier and Bigelow 2000; Dalle-Donne, Rossi et al. 2003; Chakravarti and Chakravarti 2007; Babusikova, Jesenak et al. 2008; Choksi and Papaconstantinou 2008; Feng, Xie et al. 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado que os produtos carbonilo mais comuns são: prolina e arginina a γ -glutamil semialdeído, lisina a aminoadípico semialdeído e a treonina a aminocetobutirato (Requena, Levine et al. 2003; Pamplona, Dalfo et al. 2005; Soskic, Groebe et al. 2008). Além disso, os grupos carbonilos podem ser introduzidos nas proteínas por reacções secundárias da cadeia lateral nucleofílica dos resíduos de cisteína, histidina e lisina com aldeídos (4-hidroxi-2-nonenal, malondialdeído, 2-propenol), produzidos durante a peroxidação lipídica ou com derivados de carbonilos reactivos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como consequência da reacção de redução de hidratos de carbono, ou os seus produtos de oxidação com resíduos de lisina das proteínas (reacção de glicação e glicosilação), com eventual formação de produtos finais da glicação/lipoxidação avançada, isto é, produtos de glicosilação, tais como carboximetil lisina e pentodesina, e produtos da lipoxidação, tais como malondialdeído-lisina e aductos proteicos 4-hidroxi-nonenal (Dalle-Donne, Rossi et al. 2003). Nem todas as modificações oxidativas das proteínas resultam na formação de grupos carbonilo. Por exemplo, a oxidação dos resíduos de histidina a oxo-histidina e os seus produtos de degradação, a fenilalanina a orto- e meta-tirosina, ou a conversão da metionina a metionina sulfóxido (Requena, Levine et al. 2003). Frequentemente, a determinação dos grupos carbonilos nas proteínas é usado como um indicador global do stress oxidativo (Chakravarti and Chakravarti 2007). Vários estudos sobre modificações oxidativas de proteínas têm revelado um aumento relacionado com a idade dos níveis de proteínas carboniladas (Beal 2002; Levine 2002; Shringarpure and Davies 2002; Stadtman 2002; Requena, Levine et al. 2003; Chakravarti and Chakravarti 2007; Chung, Miranda et al. 2008; Murray, Oquendo et al. 2008), do teor de 3-nitrotirosina, de metioninas oxidadas (Wells-Knecht, Lyons et al. 1997), de ligações cruzadas proteína-proteína (por exemplo: ditirosinas) (Squier and Bigelow 2000; Giulivi, Traaseth et al. 2003; Stadtman and Levine 2003), de proteínas glicadas (Baynes 2001; Soskic, Groebe et al. 2008), bem como a diminuição da actividade catalítica enzimática (Rothstein 1985) e uma maior susceptibilidade das proteínas à degradação (Requena, Levine et al. 2003; Taylor, Fahy et al. 2003). Tem-se verificado que o teor de grupos carbonilos aumenta drasticamente

no último terço de vida, podendo modificar uma em cada três proteínas (Levine 2002; Hipkiss 2006). Agarwal *et al.* (1995) sugeriram que as proteínas de elevado peso molecular são preferencialmente oxidadas durante o envelhecimento e verificaram que as fracções de proteínas mitocondriais de elevado peso molecular exibem aproximadamente mais 120% de grupos carbonilos quando comparados com as proteínas de baixo peso molecular. Estas modificações oxidativas das proteínas causam normalmente perda da função catalítica e estrutural (Levine 2002; Prokai, Yan et al. 2007), pelo que, a detecção de elevados teores de grupos carbonilo não é só um indicador de stress oxidativo mas também de disfunção da proteína (Dalle-Donne, Rossi et al. 2003).

Choski *et al.* (2004) identificaram várias subunidades carboniladas dos complexos respiratórios I, II, III e V de mitocôndrias de coração. Num estudo recente realizado por Chung *et al.* (2008) várias proteínas carboniladas foram identificadas como alvo de modificações oxidativas associadas com a idade em mitocôndrias IMF de coração de rato. Efectivamente, estes autores observaram como proteínas alvo da carbonilação associada à idade a aconitase hidratase e as cadeias polipeptídicas α e β da F_1 -ATP sintetase. No entanto, neste estudo não foi identificada a localização precisa destas modificações na estrutura da proteína.

A mitocôndria é também considerada o principal local de nitração de tirosinas que ocorre principalmente na matriz mitocondrial. Tal facto não constitui surpresa, pois a principal fonte de ROS são os complexos I e III da cadeia respiratória (Abello, Kerstjens et al. 2009). A nitração de resíduos de tirosina representa um local proeminente para a modificação oxidativa ocorrendo em muitas condições patológicas pelo que é usado como marcador do stress oxidativo (Beal 2002). No entanto, tem sido também sugerido que as proteínas nitradas podem participar na sinalização celular (Gow, Farkouh et al. 2004; Distler, Kerner et al. 2007). Os resíduos de tirosina podem ser oxidados por ONOO^- , hipoclorito ou radicais livres formados por iões metálicos – reacções de Fenton e Haber-Weiss (Soskic, Groebe et al. 2008). Os radicais de tirosina não reagem directamente com o ONOO^- , dado não aumentar a taxa de degradação do ONOO^- . Apesar disso, a exposição ao ONOO^- leva à formação de 3-nitrotirosina, 3-hidroxitirosina e 3,3'-ditirosina (Alvarez and Radi 2003). A nitração da tirosina é uma modificação proteica covalente que resulta na adição de um grupo nitro ($-\text{NO}_2$) a um dos dois carbonos orto equivalentes do anel aromático dos resíduos aromáticos (Ischiropoulos 2003). A nitração da tirosina a 3-nitrotirosina representa um marcador das PTMs associado a várias patologias (fibrose cística, doenças cardiovasculares, diabetes, doença de Parkinson) (Friguet, Bulteau et al. 2008; Souza, Peluffo et al. 2008) e ao

processo biológico de envelhecimento (Beal 2002; Kanski, Alterman et al. 2003; Kanski, Hong et al. 2005). O envelhecimento biológico pode levar a formação significativa de 3-nitrotirosina no músculo-esquelético (Kanski, Alterman et al. 2003; Kanski, Hong et al. 2005) e cardíaco (Kanski, Behring et al. 2005). Normalmente, a detecção da 3-nitrotirosina tem sido considerado um marcador da produção de ONOO^- embora seja mais correctamente considerado um marcador dos oxidantes derivados do NO^\bullet . (Pietraforte, Salzano et al. 2003; Yamakura and Ikeda 2006; Abello, Kerstjens et al. 2009; Ischiropoulos 2009).

Um estudo de Van der Loo *et al.* (2000) demonstrou que existe uma acumulação de proteínas nitradas nas aortas de ratos velhos quando comparados com os ratos novos. Uma das proteínas nitradas identificada foi a MnSOD. Esta proteína é nitrada na Tyr³⁴ com consequente redução significativa da sua actividade enzimática (Yamakura, Taka et al. 1998), sendo encontrada em processos inflamatórios agudos e crónicos tanto em modelos animais como em humanos (Radi 2004). O grau de nitração da MnSOD pode ser considerado um marcador do envelhecimento vascular (van der Loo, Labugger et al. 2000). Para além da MnSOD, outras proteínas nitradas têm sido identificadas tanto *in vitro* como *in vivo*, nomeadamente o citocromo c (Cassina, Hodara et al. 2000; Castro, Eiserich et al. 2004; Nakagawa, Komai et al. 2007) e a ATP sintetase (Cassina and Radi 1996). Kanski *et al.* (2003; Kanski, Behring et al. 2005) também demonstraram um aumento das proteínas nitradas com o envelhecimento, em músculo-esquelético e cardíaco de rato, pois estão expostas constantemente ao NO^\bullet e ao anião $\text{O}_2^{\bullet-}$, durante a contracção muscular e o relaxamento. No entanto, outro estudo (Leeuwenburgh, Hansen et al. 1998) indicou não existir um aumento significativo dos níveis de nitrotirosina no músculo-esquelético, cardíaco e no fígado de ratos velhos, sugerindo que os danos nas proteínas pelos RONS não se acumulam nestes tecidos com o avanço da idade.

A ditirosina é formada através da ligação carbono-carbono entre duas tirosinas próximas (Balasubramanian and Kanwar 2002). Esta ligação pode ocorrer entre dois resíduos de tirosina na mesma molécula (intramolecular) ou entre duas moléculas (intermolecular), em que esta última leva a um aumento do peso molecular dos produtos. Normalmente, as ditirosinas nas proteínas aparecem associadas a situações patológicas e anormais, e a sua presença constitui um marcador dos danos. As ditirosinas têm ocorrido com o envelhecimento e com o stress oxidativo associado ao exercício físico (Balasubramanian and Kanwar 2002). A ditirosina é um produto normal dos processos de pós-transdução e pode afectar estruturas específicas das proteínas (Giulivi, Traaseth et al. 2003; DiMarco and Giulivi 2007). A ditirosina pode ser encontrada em um número de proteínas estruturais (lisozima, mioglobina, hemoglobina) e não estruturais (insulina,

RNase, quimi tripsina) como produto do stress oxidativo e/ou nitração (DiMarco and Giulivi 2007). Babusokova *et al.* (2008) observaram que os níveis de ditirosina aumentam significativamente com o envelhecimento em mitocôndrias e em homogeneizado do músculo cardíaco. A 3,3'-ditirosina (di-Tyr) é um produto de oxidação da tirosina produzida pela ligação de dois radicais de tirosina e representa um biomarcador de proteínas modificadas oxidativamente *in vivo* (Ptolemy, Lee et al. 2007).

Para além da tirosina, os aminoácidos de anel aromático como o triptofano e a fenilalanina são também importantes alvos dos RONS (Giulivi, Traaseth et al. 2003; Ptolemy, Lee et al. 2007). Efectivamente, o triptofano é outro resíduo comumente afectado pelas modificações oxidativas. A dupla oxidação dos resíduos de triptofano gera *N-formilquinurenina*, que pode ser gerada enzimaticamente ou não enzimaticamente (Yamakura, Taka et al. 1998; Taylor, Fahy et al. 2003; Korlimbinis and Truscott 2006). Em um dos poucos estudos *in vivo* sobre proteínas oxidadas, Taylor *et al.* (2003) examinaram a ocorrência de *N-formilquinurenina* no proteoma mitocondrial de tecido cardíaco de humanos saudáveis e encontraram evidências de oxidações selectivas em algumas proteínas associadas predominantemente com o metabolismo redox, incluindo proteínas da cadeia respiratória mitocondrial como seis subunidades do complexo I, duas subunidades do complexo II e subunidades do complexo IV e ATP sintetase. A formação de nitrotriptofano tem sido detectada *in vitro* na proteína humana CuZnSOD depois da exposição ao ONOO⁻ na presença de dióxido de carbono (Alvarez and Radi 2003). Tem sido também sugerida a formação de 5-nitrotriptofano (5-NO₂-Trp) e 6-nitrotriptofano (6-NO₂-Trp) como os principais produtos entre o ONOO⁻ e o triptofano, bem como o 4 ou 7-nitrotriptofano mas em menor escala. Ao contrário da tirosina, o triptofano possui muitos locais que podem ser oxidados ou nitrados (Yamakura and Ikeda 2006).

A fenilalanina pode ser oxidada e, em condições *in vivo*, forma dois isómeros de tirosina, denominado de orto- e meta-tirosina. A estabilidade dos isómeros tem sido usada como um indicador indirecto da formação de HO[•] e parece estar associado com o envelhecimento bem como com doenças crónicas (Ptolemy, Lee et al. 2007). A fenilalanina tal como a tirosina não reage directamente com o peroxinitrito, no entanto a sua exposição pode levar à formação de nitrofenilalanina (Alvarez and Radi 2003).

Aminoácidos como a cisteína, metionina e o triptofano reagem directamente com o ONOO⁻. Os resíduos de tirosina, fenilalanina e histidina apesar de não reagirem directamente com o ONOO⁻ também são modificados por radicais secundários derivados do ONOO⁻ (Alvarez and Radi 2003; Abello, Kerstjens et al. 2009). A formação de o-

tirosina e m-tirosina, bem como de nitrofenilalanina e nitrotirosina, têm sido interpretados como indicadores da formação de ONOO^- (Alvarez and Radi 2003).

Normalmente, estas modificações oxidativas das proteínas podem resultar na redução da função normal ou num aumento da função tóxica relacionada com a idade ou com doenças associadas à idade (Requena, Levine et al. 2003). A acumulação de proteínas oxidadas nestas condições pode ser reflexo de danos aleatórios no DNA de um ou mais genes que codificam proteínas que regulam a produção de ROS, ou dos sistemas antioxidantes, e da actividade proteolítica (Chao, Ma et al. 1997; Requena, Levine et al. 2003). Assim, a monitorização da alteração das proteínas constitui um importante marcador do envelhecimento.

Embora importantes para a função celular, as PTMs, são muitas vezes difíceis de detectar mesmo usando técnicas analíticas tais como a electroforese em gel e a espectrometria de massa. Estas dificuldades resultam de vários factores, incluindo a menor abundância relativa da proteína modificada, quando comparada com a proteína normal (Distler et al., 2007).

6.Acumulação de proteínas oxidadas e envelhecimento

Os níveis de PTMs nas proteínas dependem de múltiplos factores que influenciam a taxa de geração de ROS, a capacidade da célula para neutralizar as ROS, e também os níveis e actividade dos sistemas proteolíticos que catalisam a degradação de proteínas modificadas (Stadtman and Levine 2003).

Os lisossomas e os proteossomas são dois sistemas proteolíticos intracelulares diferentes envolvidos na degradação endógena das proteínas (Friguet 2006; Cekarini, Gee et al. 2007). Em células jovens e saudáveis, a acumulação de proteínas oxidadas é prevenida pela rápida eliminação das proteínas antes que estas formem agregados (Shringarpure and Davies 2002). Se as proteínas oxidadas não forem eliminadas através de sistemas proteolíticos, ficam disponíveis para formarem agregados proteicos que podem alterar a função celular e levar à apoptose (Cekarini, Gee et al. 2007). Observações sugerem que o envelhecimento afecta a degradação proteolítica das proteínas, estando a actividade dos lisossomas e proteossomas diminuída (Chakravarti and Chakravarti 2007). Esta disfunção da actividade proteolítica pode ser responsável pela acumulação de proteínas (Shacter 2000; Chakravarti and Chakravarti 2007) e muitas vezes é acompanhada por um aumento dos níveis de proteínas oxidadas com a idade, sugerindo que estes dois eventos podem estar relacionados (Stadtman and Levine 2003). Tem-se observado um aumento da oxidação de proteínas e diminuição do *turnover* das proteínas durante o envelhecimento (Stadtman and Levine 2003). A actividade do

proteossoma diminui com o envelhecimento em humanos, em roedores, bem como em microrganismos e esta alteração tem sido observada em vários órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso central, a retina e o músculo (Chakravarti and Chakravarti 2007).

Recentemente, tem sido proposta a existência de actividade de desnitração e nitração de proteínas na mitocôndria (Bailey, Landar et al. 2005; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008). Pelo que a acumulação de proteínas com tirosinas nitradas depende da taxa de degradação e processo de nitração/desnitração (Abello, Kerstjens et al. 2009). Elfering *et al.* (2004) observaram fracções de mitocôndrias de fígado de rato e verificaram que os resíduos de tirosina nitrados não se correlacionam com a média de semi-vida das proteínas, indicando que as proteínas de longa duração não têm necessariamente maior probabilidade de serem nitradas. Frequentemente, as proteínas têm sido expostas a agentes nitrantes *in vitro* para predizer a sensibilidade das tirosinas à nitração *in vivo*. Isoformas específicas de proteínas com resíduos de tirosina podem ser eliminadas *in vivo* através da degradação mediada pelo proteossoma ou desnitração (Abello, Kerstjens et al. 2009).

7.Citocromo c

O citocromo c foi descrito pela primeira vez por MacMunn há mais de cem anos (1886). Esta proteína tem sido exhaustivamente estudada devido ao seu papel central na transferência de electrões nos organismos vivos e no processo de apoptose (Lee, Salomon et al. 2006).

O citocromo c é uma pequena proteína globular de aproximadamente 12kDa (Cassina, Hodara et al. 2000; Kluck, Ellerby et al. 2000; Isom, Barnes et al. 2004; Nukuna, Sun et al. 2004; Batthyany, Souza et al. 2005; Huttemann, Lee et al. 2008; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008; Thariat, Collin et al. 2008), codificada por genes nucleares e traduzida no citosol (Scarpulla, Agne et al. 1981; Kluck, Ellerby et al. 2000; Hamel, Corvest et al. 2009). O apocitocromo c resultante é subsequentemente transportado através da membrana externa (Kluck, Martin et al. 1997; Kluck, Ellerby et al. 2000; Garrido, Galluzzi et al. 2006; Hamel, Corvest et al. 2009) para o espaço intermembranar mitocondrial (Cassina, Hodara et al. 2000; Kluck, Ellerby et al. 2000; Phaneuf and Leeuwenburgh 2002; Castro, Eiserich et al. 2004; Isom, Barnes et al. 2004; Nukuna, Sun et al. 2004; Batthyany, Souza et al. 2005; Garrido, Galluzzi et al. 2006; Huttemann, Lee et al. 2008; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008; Souza, Castro et al. 2008; Thariat, Collin et al. 2008). No espaço intermembranar, o heme é

covalentemente ligado à proteína por uma reacção catalisada pela enzima citocromo c heme liase (Kluck, Ellerby et al. 2000; Hamel, Corvest et al. 2009). O citocromo c encontra-se associado à membrana interna mitocondrial através de interacções com o citocromo c1 e com a subunidade II da citocromo c oxidase (Isom, Barnes et al. 2004). Esta proteína multifuncional existe no espaço intermembranar em concentrações superiores a 1mM (Radi, Cassina et al. 2002; Batthyany, Souza et al. 2005; Abriata, Cassina et al. 2009). Como parte da ETC, o citocromo c aceita um electrão do complexo bc1 – citocromo c reductase (complexo III) e transfere-o para a citocromo c oxidase (complexo IV) (Banci, Bertini et al. 1999; Cassina, Hodara et al. 2000; Isom, Barnes et al. 2004; Garrido, Galluzzi et al. 2006; Larson, Dwyer et al. 2006; Lee, Salomon et al. 2006; Huttemann, Lee et al. 2008; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008; Solmaz and Hunte 2008; Souza, Castro et al. 2008; Thariat, Collin et al. 2008; Yu, Lee et al. 2008; Patriarca, Eliseo et al. 2009). Adicionalmente, esta proteína solúvel em água quando libertada para o citosol activa o processo de apoptose ao ligar-se ao factor Apaf-1 que activa a pró-caspase-9 (Cassina, Hodara et al. 2000; Kluck, Ellerby et al. 2000; Isom, Barnes et al. 2004; Garrido, Galluzzi et al. 2006; Yu, Lee et al. 2008; Abriata, Cassina et al. 2009; Patriarca, Eliseo et al. 2009). No entanto, os mecanismos que medeiam a libertação do citocromo c da mitocôndria bem como os eventos que desencadeiam a apoptose permanecem por esclarecer (Cassina, Hodara et al. 2000; Kluck, Ellerby et al. 2000; Lee, Salomon et al. 2006).

7.1 Estrutura do citocromo c

A sequência completa de aminoácidos do citocromo c de 96 eucariotas foi determinada, constituindo uma importante fonte de informação para a análise evolutiva e para a avaliação da relação estrutura-função (Kluck, Ellerby et al. 2000). A sequência primária é altamente conservada entre os eucariotas com resíduos idênticos que variam entre 45% e 100% de homologia (Banci, Bertini et al. 1999). Nos quadros 1 e 2 encontram-se as sequências de resíduos de aminoácidos do citocromo c somático de ratinho (*Mus musculus*) e de cavalo (*Equus caballus*), respectivamente.

Quadro 1: Sequência de resíduos de aminoácidos do citocromo c somático de *Mus musculus* (house mouse) de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), número de acesso NP_031834. (Os resíduos conservados encontram-se representados a negrito. A vermelho encontram-se representados os resíduos susceptíveis ao ONOO⁻).

Met.Gly¹.Asp².Val³.Glu⁴.Lys⁵.Gly⁶.Lys⁷.Lys⁸.Ile⁹.Phe¹⁰.Val¹¹.Gln¹².Lys¹³.**Cys**¹⁴.Ala¹⁵.Gln¹⁶.**Cys**¹⁷.
His¹⁸.Thr¹⁹.Val²⁰.Glu²¹.Lys²².Gly²³.Gly²⁴.Lys²⁵.His²⁶.Lys²⁷.Thr²⁸.Gly²⁹.Pro³⁰.Asn³¹.Leu³².His³³.Gly³⁴.Leu³⁵.Phe³⁶.Gly³⁷.Arg³⁸.Lys³⁹.Thr⁴⁰.Gln⁴¹.Gln⁴².Ala⁴³.Ala⁴⁴.Gly⁴⁵.Phe⁴⁶.Ser⁴⁷.**Tyr**⁴⁸.Thr⁴⁹.Asp⁵⁰.Ala⁵¹.Asn⁵².Lys⁵³.Asn⁵⁴.Lys⁵⁵.Gly⁵⁶.Ile⁵⁷.Thr⁵⁸.**Trp**⁵⁹.Gly⁶⁰.Gly⁶¹.Asp⁶².Thr⁶³.Leu⁶⁴.Met⁶⁵.Glu⁶⁶.**Tyr**⁶⁷.Leu⁶⁸.Glu⁶⁹.Asn⁷⁰.Pro⁷¹.Lys⁷².Lys⁷³.**Tyr**⁷⁴.Ile⁷⁵.Pro⁷⁶.Gly⁷⁷.Thr⁷⁸.Lys⁷⁹.**Met**⁸⁰.Ile⁸¹.Phe⁸².Ala⁸³.Gly⁸⁴.Ile⁸⁵.Lys⁸⁶.Lys⁸⁷.Lys⁸⁸.Gly⁸⁹.Glu⁹⁰.Arg⁹¹.Ala⁹².Asp⁹³.Leu⁹⁴.Ile⁹⁵.Ala⁹⁶.**Tyr**⁹⁷.Leu⁹⁸.Lys⁹⁹.Lys¹⁰⁰.Ala¹⁰¹.Thr¹⁰².Asn¹⁰³.Glu¹⁰⁴

Quadro 2: Sequência de resíduos de aminoácidos do citocromo c de *Equus caballus* obtido de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), número de acesso P00004. (Os resíduos conservados encontram-se representados a negrito. A vermelho encontram-se representados os resíduos susceptíveis ao ONOO⁻).

Met.Gly¹.Asp².Val³.Glu⁴.Lys⁵.Gly⁶.Lys⁷.Lys⁸.Ile⁹.Phe¹⁰.Val¹¹.Gln¹².Lys¹³.**Cys**¹⁴.Ala¹⁵.Gln¹⁶.**Cys**¹⁷.
His¹⁸.Thr¹⁹.Val²⁰.Glu²¹.Lys²².Gly²³.Gly²⁴.Lys²⁵.His²⁶.Lys²⁷.Thr²⁸.Gly²⁹.Phe³⁰.Asn³¹.Leu³².His³³.Gly³⁴.Leu³⁵.Phe³⁶.Lys³⁷.Arg³⁸.Lys³⁹.Thr⁴⁰.Gln⁴¹.Gln⁴².Ala⁴³.Pro⁴⁴.Gly⁴⁵.Phe⁴⁶.Phe⁴⁷.**Tyr**⁴⁸.Thr⁴⁹.Asp⁵⁰.Ala⁵¹.Asn⁵².Lys⁵³.Met⁵⁴.Lys⁵⁵.Gly⁵⁶.Ile⁵⁷.Thr⁵⁸.**Trp**⁵⁹.Lys⁶⁰.Glu⁶¹.Glu⁶².Thr⁶³.Leu⁶⁴.Met⁶⁵.Glu⁶⁶.**Tyr**⁶⁷.Leu⁶⁸.Glu⁶⁹.Asn⁷⁰.Phe⁷¹.Lys⁷².Lys⁷³.**Tyr**⁷⁴.Ile⁷⁵.Pro⁷⁶.Gly⁷⁷.Thr⁷⁸.Lys⁷⁹.**Met**⁸⁰.Ile⁸¹.Phe⁸².Ala⁸³.Gly⁸⁴.Ile⁸⁵.Lys⁸⁶.Lys⁸⁷.Lys⁸⁸.Thr⁸⁹.Glu⁹⁰.Arg⁹¹.Glu⁹².Asp⁹³.Leu⁹⁴.Ile⁹⁵.Ala⁹⁶.**Tyr**⁹⁷.Leu⁹⁸.Lys⁹⁹.Lys¹⁰⁰.Ala¹⁰¹.Thr¹⁰².Asn¹⁰³.Glu¹⁰⁴

O citocromo c dos mamíferos é constituído por uma única cadeia polipeptídica de 104 resíduos de aminoácidos, sem a metionina inicial, contendo um grupo porfirínico com um átomo de ferro central, denominado por grupo heme que desempenha um papel fulcral nas reacções redox (Garrido, Galluzzi et al. 2006; Lee, Salomon et al. 2006; Souza, Castro et al. 2008; Yu, Lee et al. 2008). O ferro do citocromo c oscila entre o estado reduzido ou ferroso (Fe²⁺) e o estado oxidado ou férrico (Fe³⁺), permitindo desta forma a transferência de electrões (Souza, Castro et al. 2008; Abriata, Cassina et al. 2009). A cadeia polipeptídica encontra-se ligada covalentemente ao grupo heme através de uma ligação tioéster a duas cisteínas – Cys¹⁴ e Cys¹⁷ (Banci, Bertini et al. 1999; Kluck,

Ellerby et al. 2000; Lee, Salomon et al. 2006; Souza, Castro et al. 2008; Thariat, Collin et al. 2008; Abriata, Cassina et al. 2009; Hamel, Corvest et al. 2009). O ferro do grupo heme é hexacoordenado pela His¹⁸ e Met⁸⁰, no quinto e sexto ligando, respectivamente (Figura 8) (Banci, Bertini et al. 1999; Lee, Salomon et al. 2006; Souza, Castro et al. 2008; Abriata, Cassina et al. 2009). Para além destes quatro resíduos, existem outros que foram conservados durante a evolução, por exemplo, quatro resíduos de tirosina (Try⁴⁸, Tyr⁶⁷, Tyr⁷⁴ e Try⁹⁷) e nove resíduos de lisina (Souza, Castro et al. 2008) que contribuem para o ponto isoeléctrico relativamente elevado de 9,6 desta proteína (Cassina, Hodara et al. 2000; Isom, Barnes et al. 2004). A Tyr⁶⁷ é o resíduo de tirosina que se encontra mais próximo do grupo heme, e está adjacente à Met⁸⁰, enquanto que a Tyr⁴⁸ se encontra no lado oposto do heme (Figura 8) (Souza, Castro et al. 2008; Abriata, Cassina et al. 2009). A hélice N-terminal apresenta maior variabilidade do que a região C-terminal. A região melhor conservada compreende os resíduos 67-87, contendo também a Met⁸⁰. Em particular a região que rodeia a His axial é ligeiramente mais variável do que a região em torno da Met axial (Banci, Bertini et al. 1999).

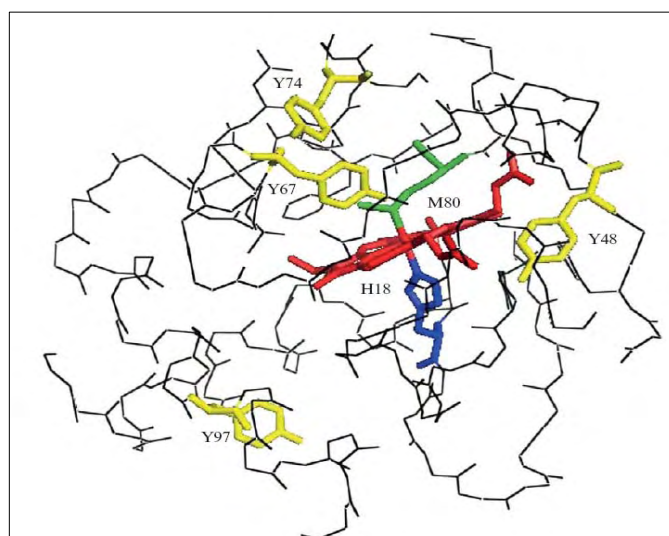


Figura 8: Estrutura tridimensional do citocromo c. Os quatro resíduos de tirosina estão representados a amarelo. Adicionalmente a estrutura mostra o grupo heme (vermelho) e os seus ligandos, quinto e sexto, His-18 (azul) e Met-80 (verde), respectivamente. (Souza, Castro et al. 2008).

7.2 Modificações pós-traducionais do Citocromo c

Como proteína confinada ao espaço intermembranar mitocondrial (Jang and Han 2006) e existindo em elevadas concentrações, o citocromo c (Cassina, Hodara et al. 2000) é um dos principais alvos de RONS (Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008; Souza, Castro et al. 2008) e está, por isso, sujeito a modificações pós-traducionais (Kluck, Ellerby et al. 2000; Batthyany, Souza et al. 2005). As PTMs no citocromo c podem

ter importantes consequências estruturais e funcionais (Kluck, Ellerby et al. 2000; Castro, Eiserich et al. 2004; Batthyany, Souza et al. 2005; Souza, Castro et al. 2008; Abriata, Cassina et al. 2009). Os danos oxidativos no citocromo c mitocondrial, em condições fisiologicamente normais, estão associados a várias doenças e à apoptose bem como parecem desempenhar um papel importante no processo de envelhecimento (Kim, Rodriguez et al. 2008).

Entre outras possibilidades, o citocromo c tanto pode ser nitrado como nitrosilado (Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008). Como já mencionado anteriormente (ponto 5.), a nitração de proteínas é um dos efeitos mais comuns das RONS na célula. Apesar de este processo não ser catalisado enzimaticamente, é muito específico, pois são poucos os resíduos (principalmente tirosinas) preferencialmente nitradas (Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008). A nitração pós-traducional de tirosina tem como produto a 3-nitrotirosina que tem sido detectada em vários órgãos e tipos de células de modelos animais com inflamação crónica ou aguda e doença degenerativa (Alvarez and Radi 2003; Castro, Eiserich et al. 2004; Souza, Castro et al. 2008). As tirosinas podem ser nitradas pelo ONOO^- , que é um potente oxidante, mais reactivo que os seus precursores $\text{O}_2^{\cdot-}$ e NO^{\cdot} (Alvarez and Radi 2003). A mitocôndria produz tanto $\text{O}_2^{\cdot-}$ como NO^{\cdot} pelo que a formação de ONOO^- , é muito provável. O citocromo c é nitrado pelo ONOO^- , e por mecanismos relacionados com a peroxidase na presença de H_2O_2 , nitrito ($-\text{NO}_2$) ou NO^{\cdot} (Cassina, Hodara et al. 2000; Castro, Eiserich et al. 2004; Chen, Chen et al. 2004; Batthyany, Souza et al. 2005). A nitrosilação é uma PTM que envolve a ligação do grupo NO^{\cdot} a uma cisteína ou a um metal de transição (Schonhoff, Gaston et al. 2003). Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem que a função de muitas proteínas pode ser afectada por esta modificação, *in vivo* tem sido descrito um número limitado de proteínas nitrosiladas (Schonhoff, Gaston et al. 2003).

Os vários estudos existentes que determinaram quais as PTMs do citocromo c e quais os efeitos nas propriedades do citocromo c, foram sobretudo realizados *in vitro*. A nitração do citocromo c por ONOO^- , (Cassina, Hodara et al. 2000; Batthyany, Souza et al. 2005; Jang and Han 2006; Abriata, Cassina et al. 2009) e tetranitrometano (TNM) têm sido estudadas (Batthyany, Souza et al. 2005; Souza, Castro et al. 2008) *in vitro*. Os primeiros estudos realizados em citocromo c de coração de cavalo mostraram que a exposição ao excesso de TNM, agente oxidante, resulta na nitração da tirosina, nomeadamente a Tyr⁶⁷, e esta alteração foi acompanhada por alterações nas propriedades físico-químicas e na função do citocromo c ao nível da cadeia respiratória

(Souza, Castro et al. 2008). De acordo com Cassina *et al.* (2000), a forma oxidada de citocromo c (citocromo c^{3+}) foi mais extensivamente nitrada do que a forma reduzida (citocromo c^{2+}), apoiando uma reacção preferencial entre o grupo heme reduzido e o $ONOO^-$. A adição de $ONOO^-$ ao citocromo c resultou na nitração da proteína, nomeadamente no resíduo Tyr⁶⁷, tendo-o considerado o principal local de nitração por $ONOO^-$. Uma vez nitrada, a Tyr⁶⁷ pode afectar a interacção entre o grupo heme-Met-80, uma vez que esta está intimamente ligada à Met⁸⁰, levar a um aumento da actividade peroxidase e tornar a proteína resistente à redução por ascorbato. Além disso, o citocromo c tratado com peroxinitrito perde a capacidade de transportar electrões da cadeia respiratória (Cassina, Hodara et al. 2000). É interessante verificar que apesar de a Tyr⁶⁷ ser a tirosina mais interna, é o principal local de nitração por $ONOO^-$ (Cassina, Hodara et al. 2000) no entanto, isto pode ser devido ao facto de ser o resíduo mais próximo do grupo heme. Segundo o estudo de Batthyany *et al.* (2005), o $ONOO^-$ medeia a nitração do citocromo c^{3+} em quatro resíduos de tirosina (Tyr⁹⁷, Tyr⁷⁴, Tyr⁶⁷, Tyr⁴⁸), mas numa ordem preferencial e não aleatória. Com baixas concentrações de peroxinitrito, os principais produtos de reacção com o citocromo c foram dois resíduos de Tyr (Tyr⁹⁷ e Tyr⁷⁴) mononitrados. Com doses mais elevadas de $ONOO^-$, todos os quatro resíduos de tirosina foram nitrados incluindo espécies di e trinitradas, com a Tyr⁶⁷ bem representada em espécies dinitradas e a Tyr⁴⁸ como a menos propensa a nitração. O padrão de nitração do citocromo c pelo TMN foi comparado com o obtido com o peroxinitrito, mas com um aumento relativo da nitração na Tyr⁶⁷ (Batthyany, Souza et al. 2005). A Tyr⁹⁷ e Tyr⁷⁴ estão expostas na superfície da proteína e cercadas por resíduos carregados. As Tyr⁶⁷ e Tyr⁴⁸ são resíduos internos, num ambiente mais hidrofóbico. Estas características estruturais próprias podem ser uma explicação para a nitração preferencial da Tyr⁹⁷ e Tyr⁷⁴ pelo peroxinitrito (Batthyany, Souza et al. 2005). Todos os citocromos c mononitrados revelaram uma actividade de peroxidase aumentada, embora mais acentuada para o resíduo Tyr⁷⁴. A nitração de Tyr⁶⁷ e Tyr⁷⁴ leva a grandes alterações na capacidade de transporte de electrões, tendo um profundo efeito na função do citocromo c (Batthyany, Souza et al. 2005). No estudo de Nakagawa *et al.* (2001), o citocromo c foi tratado com um excesso de $ONOO^-$ de 2,5 molar (62,5 μ M de $ONOO^-$, para 25 μ M de citocromo c), que é considerado a concentração mais próxima da fisiológica. Verificaram que 1/3 das moléculas de citocromo c foram modificadas pelo $ONOO^-$ e foram convertidos em 3-nitrotirosina. O tratamento com baixas concentrações de $ONOO^-$ é suficiente para a nitração dos resíduos de tirosina. A nitração do citocromo c parece diminuir o potencial de membrana mitocondrial e este pode ser o mecanismo responsável pela diminuição na formação de energia (Nakagawa, Ohshima et al. 2001). À semelhança

do que verificou Cassina *et al.* (2000), Jang *et al.* (2006) também demonstraram que com a adição de ONOO⁻ a ligação heme-metionina é quebrada.

A formação de nitrotirosina no citocromo c tem sido observada em células e *in vivo* incluindo macrófagos tratados com NO (Hortelano, Alvarez *et al.* 1999), células cancerosas tratadas com peroxinitrito (Ueta, Kamatani *et al.* 2003), neurónios privados de oxigénio e glicose (Alonso, Encinas *et al.* 2002), rins de rato com nefropatia crónica (MacMillan-Crow, Cruthirds *et al.* 2001), células renais submetidas a isquemia e reperfusão (Cruthirds, Novak *et al.* 2003).

Existem poucos estudos que avaliam as oxidações do citocromo c por ROS *in vitro* e não se conhecem estudos realizados *in vivo*. No entanto, a Met⁸⁰ é facilmente oxidada por oxidantes como hipoclorito (Chen, Deterding *et al.* 2002), pelo oxigénio singleto (¹O₂) (Kim, Rodriguez *et al.* 2008; Thariat, Collin *et al.* 2008) e pelo péroxido de hidrogénio (Kim, Jeong *et al.* 2006). Chen (2002) avaliou se o citocromo c é modificado por espécies reactivas halogenadas, em baixas concentrações (HOCl/citocromo c=0,2/2), e verificou que a Met⁸⁰ é oxidada a metionina sulfóxido. Verificou que a actividade de peroxidase está aumentada e que há um aumento da formação de radicais tirosil derivados do citocromo c. No entanto, as Cys¹⁴ e Cys¹⁷ que estão covalentemente ligadas ao grupo porfirínico não foram afectadas (Chen, Deterding *et al.* 2002). Outros estudos avaliaram se o citocromo c é modificado pela presença de HO[•] e de O₂^{-•}, gerados por radiólise (Nukuna, Sun *et al.* 2004; Thariat, Collin *et al.* 2008) e verificaram que vários resíduos podem ser alvo de danos oxidativos destas espécies reactivas. Nukuna *et al.* (2004) encontraram quatro peptídeos oxidados e os resíduos oxidados identificados foram: Phe³⁶, Met⁸⁰, Phe¹⁰, Phe⁴⁶, Met⁶⁵, Tyr⁷⁴, Phe⁸² e Tyr⁹². Mais tarde Thariat *et al.* (2008), utilizando doses mais baixas de radiação das usadas no estudo de Nukuna *et al.* (2004) identificaram a Phe³⁰ e Met⁸⁰ como resíduos modificados oxidativamente. Kim *et al.* (2006) estudaram as modificações oxidativas do citocromo c pelo H₂O₂. Quando o citocromo c foi incubado com H₂O₂, a oligomerização da proteína aumentou e a formação de grupos carbonilos e ditirosina foi estimulada. Para além disso, verificaram que os resíduos de tirosina, histidina e metionina são particularmente sensíveis à oxidação por H₂O₂ (Kim, Jeong *et al.* 2006), no entanto, não identificaram quais os resíduos modificados.

O citocromo c é importante na regulação da homeostasia celular e na regulação da apoptose. Estudos sugerem que a apoptose pode não ser apenas regulada pelos níveis de citocromo c libertado para o citosol mas também pelas modificações directas do citocromo c (Schonhoff, Gaston *et al.* 2003; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia *et al.*

2008). No citocromo c o grupo heme é o principal alvo de nitrosilação. Estudos *in vitro* demonstraram que o grupo heme do citocromo c pode ser nitrosilado, no entanto nunca foi observado *in vivo* (Schonhoff, Gaston et al. 2003). O grupo heme do citocromo c está envolvido na associação com o Apaf-1 e é possível que a nitrosilação do heme citocromo c facilite a formação do apoptosoma, estimulando a activação da caspase-3 (Schonhoff, Gaston et al. 2003; Ow, Green et al. 2008). A nitrosilação pode ser um regulador alostérico da função do citocromo c (Schonhoff, Gaston et al. 2003). A nitratação do citocromo c tem gerado uma grande controvérsia quanto à sua função na apoptose (Ow, Green et al. 2008). Tem sido sugerido que o citocromo c nitrado actua como um sinalizador apoptótico e que pode facilitar a sua saída para o citosol (Jang and Han 2006). No entanto, outros estudos sugerem que a apoptose é activada pelo citocromo c na forma nativa, não modificado, e que a nitratação do citocromo c pode diminuir a afinidade para o Apaf-1 e consequentemente inibir a activação das caspases (Oursler, Bradley et al. 2005; Nakagawa, Komai et al. 2007; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008). Por outro lado, tem sido proposto a existência de um sistema de desnitratação *in vivo*, tendo-se colocado a possibilidade de que a nitratação pode ser usada pela célula como um sistema de sinalização (Bailey, Landar et al. 2005; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008).

O resíduo de Lys⁷² é essencial para a estabilidade da interacção entre o citocromo c e o Apaf-1; no entanto, os resíduos das posições 7, 25, 39, e 62-65 também contribuem para esta interacção (Ow, Green et al. 2008). Lee *et al.* (2006) propuseram que a fosforilação da Tyr⁹⁷ pode afectar o papel do citocromo c na apoptose porque a Lys⁷, um resíduo essencial à interacção com o Apaf-1, está localizada espacialmente a seguir à Tyr⁹⁷ e pode possivelmente formar uma ponte salina (“*salt bridge*”) neutralizando as cargas positivas dos resíduos de lisina, o que pode alterar ou impedir a indução da apoptose.

Os resíduos de lisina têm um importante papel na função do citocromo c fornecendo ligações electroestáticas para a interacção com o citocromo c oxidase, (Smith, Ahmed et al. 1981; Dopner, Hildebrandt et al. 1999; Perla-Kajan, Marczak et al. 2007) sendo os resíduos de lisina 72, 73, 79, 86, 87 aqueles que contribuem para essa interacção (Dopner, Hildebrandt et al. 1999; Ow, Green et al. 2008). Modificações nos resíduos de lisina em torno do heme do citocromo c diminuem a taxa de reacção tanto com o citocromo c₁ como com a citocromo c oxidase, sugerindo que estas lisinas facilitam ambas as reacções (Smith, Ahmed et al. 1981)

Em determinados eucariotas, incluindo plantas, fungos, e alguns protozoários, os resíduos de lisina do citocromo c são metilados. No entanto, nos mamíferos não se verificou esta metilação. A *Saccharomyces cerevisiae* contém uma trimetilisina na posição 72. Acredita-se que o apocitocromo c é trimetilado co ou pós-traducional por uma metiltransferase antes de chegar à mitocôndria. De facto, o citocromo c de vertebrados é parcialmente trimetilado quando expresso em leveduras. A função biológica e a importância da metilação é desconhecida, e as formas mutantes de iso-1-citocromo c sem metilação na posição 72 tem actividade quase plena *in vivo* (Kluck, Ellerby et al. 2000).

O citocromo c possui quatro resíduos de tirosina e cisteína susceptíveis a nitração (Nakagawa, Ohshima et al. 2001; Jang and Han 2006) e S-nitrosação (Larson, Dwyer et al. 2006). Existe alguma controvérsia quanto às propriedades redox do citocromo c nitrado, no entanto, vários grupos de investigadores concordam que a função do citocromo c nitrado ou S-nitrosilado como transportador de electrões para o consumo de oxigénio é inibida (Nakagawa, Ohshima et al. 2001; Jang and Han 2006; Larson, Dwyer et al. 2006).

Entre outras alterações induzidas pelas PTMS, as seguintes têm sido descritas: i) alterações espectrais indicam uma diminuição da coordenação do ferro pela Met⁸⁰; ii) um aumento da actividade peroxidase associada com as alterações de coordenação; iii) uma notável diminuição na capacidade do citocromo c modificado para o transporte de electrões (Cassina, Hodara et al. 2000; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008; Souza, Castro et al. 2008).

8. Influência da actividade física ao longo da vida no envelhecimento mitocondrial

A mitocôndria está intimamente ligada ao bom funcionamento do músculo-esquelético e cardíaco, pois estes organelos constituem a principal fonte energética para a contracção muscular (Chabi, Ljubcic et al. 2008). A disfunção mitocondrial pode levar a uma incapacidade em satisfazer as exigências de ATP e comprometer a adaptabilidade celular ao stress fisiológico, contribuindo para a disfunção do músculo relacionada com a idade e com a redução da capacidade aeróbia (Figueiredo, Mota et al. 2008). Têm sido propostas várias abordagens não terapêuticas para reverter esta situação. Neste sentido, vários estudos discutem os efeitos do estilo de vida sobre a plasticidade mitocondrial e o envelhecimento. A actividade física regular pode retardar o aparecimento de morbilidade (Judge and Leeuwenburgh 2007), aumentar a esperança média de vida, melhorar a coordenação motora e a saúde em geral (Navarro, Gomez et al. 2004). Além disso, o

risco de desenvolvimento de doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular e hipertensão é significativamente reduzido em indivíduos fisicamente activos, quando comparados com os sedentários (Judge and Leeuwenburgh 2007). Apesar de ser amplamente acordado que o exercício é benéfico para a saúde aumentando a longevidade, os mecanismos pelos quais o exercício exerce estes efeitos ainda não são amplamente conhecidos (Judge and Leeuwenburgh 2007).

Um programa de exercício moderado regular, com início em idade jovem, produz adaptações mitocondriais significativas tanto no músculo-esquelético como cardíaco, causando melhorias perceptíveis da capacidade oxidativa. Este aumento da capacidade oxidativa é benéfico para os tecidos, e tem sido associado a um aumento do conteúdo mitocondrial, da actividade das enzimas antioxidantes e da síntese e actividade de complexos da cadeia respiratória (Navarro, Gomez et al. 2004; Navarro and Boveris 2007). Efectivamente, tem sido sugerido que a actividade da citocromo c oxidase aumenta em vários tecidos, quando os ratos são submetidos a 24 semanas de exercício moderado regular, enquanto que os outros complexos da cadeia respiratória não demonstraram diferenças significativas (Navarro, Gomez et al. 2004; Navarro and Boveris 2007). Por outro lado, tem sido descrito que a actividade dos complexos I e IV diminui com o envelhecimento (Navarro, Gomez et al. 2005), particularmente quando associado a um estilo de vida sedentário (Navarro, Gomez et al. 2004). Para além disso, o exercício físico moderado e regular parece retardar a acumulação de danos celulares que são característicos do envelhecimento. O exercício físico tem sido associado a uma diminuição do teor de grupos carbonilos nas proteínas e produtos de oxidação (Navarro, Gomez et al. 2004) bem como a uma redução da produção mitocondrial (tanto pelas IMF como pelas SS) de H_2O_2 no coração (Judge, Jang et al. 2005).

9.Objectivos

Na tentativa de contribuir para um maior esclarecimento de alguns fenómenos associados ao envelhecimento do músculo cardíaco e de que forma são condicionados pelo estilo de vida, o presente trabalho tem como objectivos gerais: 1) caracterizar as alterações energéticas e proteicas induzidas pelo envelhecimento nas mitocôndrias do músculo cardíaco de ratinho; 2) determinar quais as proteínas do músculo cardíaco, particularmente as mitocondriais, mais susceptíveis à nitração e carbonilação e relacionar com a funcionalidade mitocondrial avaliada pela actividade dos complexos da cadeia respiratória; 3) identificar os locais de modificações pós-traducionais (oxidações e nitração) do citocromo c e relacionar com as PTMs identificadas *in vitro* utilizando o citocromo c de coração de cavalo comercial; 4) avaliar a influência do estilo de vida na

susceptibilidade das proteínas do músculo cardíaco à oxidação/nitração e nas PTMs do citocromo c relacionando com a funcionalidade da cadeia respiratória mitocondrial.

III – Material e Métodos

III. Material e Métodos

1. Desenho experimental

No sentido de concretizar os objectivos propostos para este estudo (Capítulo II - Ponto 9) efectuamos um desenho experimental que é apresentado resumidamente na figura 9. Nele são descritos os grupos experimentais utilizados bem como a abordagem metodológica aplicada que será descrita mais pormenorizadamente nos pontos seguintes.

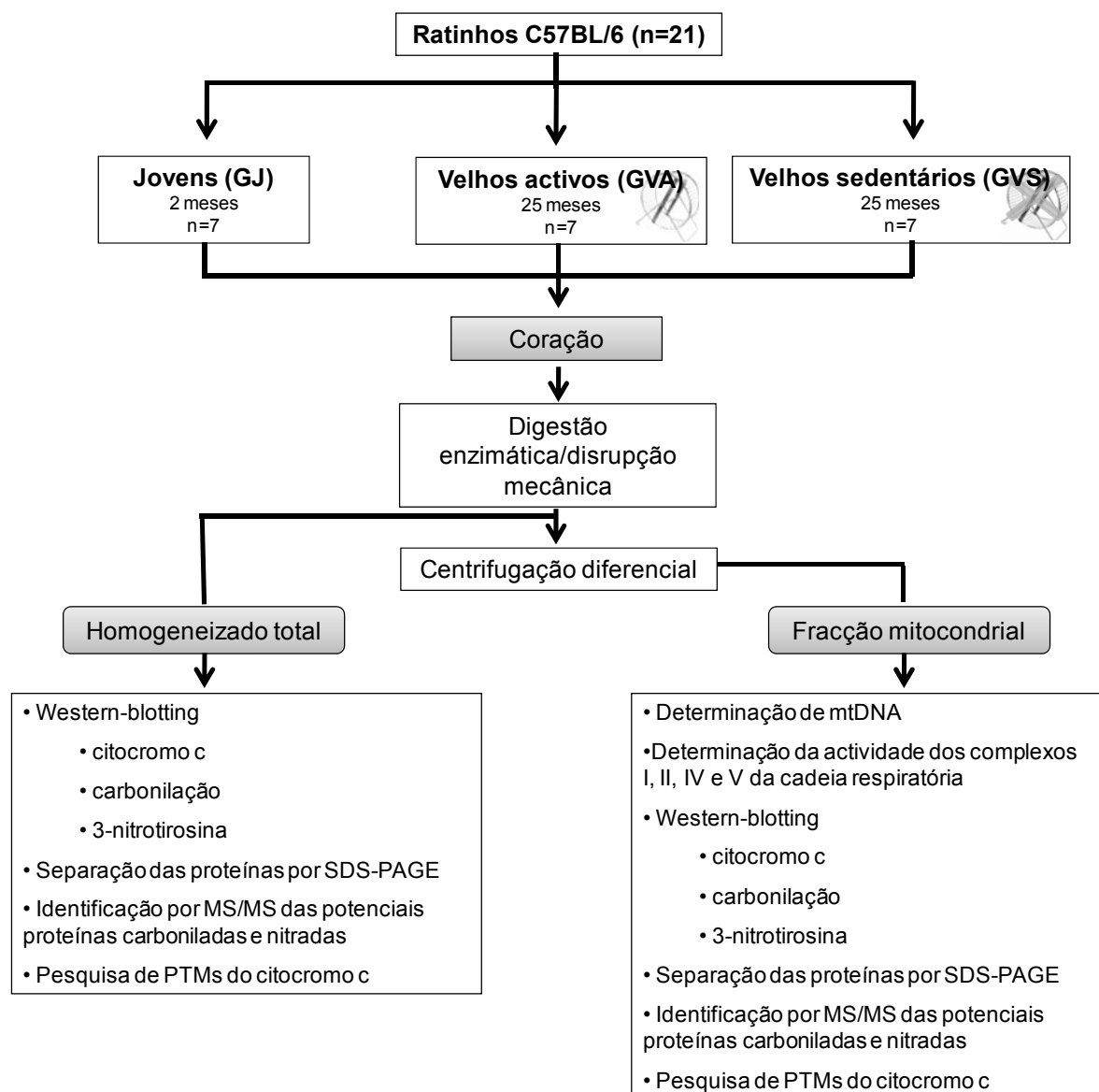


Figura 9: Esquema representativo da sequência dos procedimentos técnicos utilizados na análise de diversos parâmetros bioquímicos no músculo cardíaco de ratinhos jovens, velhos activos e velhos sedentários.

2. Protocolo animal e experimental

O protocolo experimental foi realizado com 21 ratinhos machos C57BL/6, com dois meses de idade, posteriormente divididos aleatoriamente em três grupos (grupo jovem - GJ; grupo velhos sedentários - GVS; grupo velhos activos -GVA). Os animais do GJ (n=7) foram sacrificados logo após uma semana de quarentena, com 2 meses de idade. Os animais do GVS (n=7) foram colocados individualmente em gaiolas com 355x235x190 mm (Ref. 2150E, *Tecniplast*, Itália) e os animais do GVA (n=7) foram colocados em gaiolas com 364x258x350 mm (Ref. 1284L0106, *Tecniplast*, Itália), com livre acesso a uma roda de actividade (25cm de diâmetro) durante todo o protocolo experimental. Todos os animais foram mantidos a temperatura constante (21°- 24°C) num ciclo diário de 12 horas dia - noite, com comida e água *ad libitum*. Os animais do GVS e GVA foram sacrificados com 25 meses de idade por deslocamento cervical e os corações foram extraídos para, posterior, isolamento das mitocôndrias.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as especificações e recomendações do *Guide for Care and Use of Laboratory Animal* do Institute for Laboratory Animal Research (ILAR, 1996) e após aprovação da Comissão local.

3. Isolamento de mitocôndrias do músculo cardíaco

O isolamento de mitocôndrias de coração de ratinho foi realizado usando o método convencional de centrifugação diferencial. Todos os procedimentos de isolamento das mitocôndrias foram realizados a uma temperatura entre os 0 e os 4°C.

Os corações foram colocados num meio de isolamento contendo 250mM de sacarose, 0,5mM de EGTA, 10mM de HEPES, pH de 7,4 com 0,1% de BSA *fat free* (catálogo nº A6003, Sigma). O tecido foi cortado em pequenas porções, limpo e ressuspendido numa solução gelada de meio de isolamento contendo protease subtilopeptidase A tipo VIII de *Bacillus Lichenifamis* (catálogo nº P5380; Sigma) na concentração de 1mg de enzima por cada grama de tecido. De seguida o tecido foi cuidadosamente homogeneizado com um homogeneizador Potter-Elvehjen de teflon. A suspensão foi então incubada durante um minuto no gelo e novamente homogeneizada. De seguida, centrifugou-se o homogeneizado a 14500g durante 10 minutos, a 4°C para remover a protease e o *pellet* resultante foi ressuspendido novamente em meio de isolamento e antes de se centrifugar a suspensão obtida a 750g durante 10 minutos a 4°C e retirou-se uma alíquota para posteriores análises bioquímicas. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 12000g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente, o

sobrenadante foi decantado e o *pellet* resultante foi delicadamente ressuspendido em meio de lavagem contendo 250mM de sacarose, 10mM de HEPES, pH de 7,4.

A determinação da concentração de proteína total presente nos homogeneizados de coração e na fracção mitocondrial foi efectuada com o método colorimétrico “RC DC protein assay” da BioRad. Este ensaio baseia-se numa modificação do protocolo de Lowry *et al.* (1951), permitindo a quantificação de proteína na presença de agentes redutores e detergentes. Os valores de densidade óptica foram determinados a 750nm num espectrofotómetro (Genesys 6, Thermo, USA). Simultaneamente, foi efectuada uma curva de calibração utilizando-se para o efeito padrões de albumina sérica bovina (BSA) com diferentes concentrações.

Paralelamente, determinou-se o teor de DNA presente na fracção mitocondrial utilizando o *Quant-iT™ dsDNA BR Assay* da invitrogen®. Este ensaio baseia-se no princípio da fluorescência, permitindo uma quantificação fácil e precisa. A concentração de dsDNA nas amostras ($\mu\text{g/mL}$) calculou-se segundo a equação em que a concentração de dsDNA é igual ao valor obtido no *Quant-iT™* a multiplicar pelo factor de diluição.

4.Determinação da actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

A actividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória (I, II, IV, V) foi determinada através de ensaios espectrofotométricos num leitor de placas (Tecan® Infinite M200). Todos os ensaios foram realizados a 30°C, à excepção da actividade do complexo I, num volume final de 200 μL . Em primeiro lugar as membranas das mitocôndrias foram lisadas utilizando 2 ciclos de congelação/descongelação com uma solução hipotónica (25mM de tampão fosfato de potássio, pH de 7,2) para permitir o livre acesso aos substratos de cada ensaio (Taylor, Birch-Machin et al. 1994).

A actividade específica do complexo I foi determinada pela redução de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) a 600nm ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 4 minutos, a 37°C. Seguidamente, adicionou-se 1mM de rotenona e leu-se novamente a absorvância a 600nm durante 2 minutos (Janssen, Trijbels et al. 2007). Em suma, o DCIP é usado como um aceitador final de electrões. As enzimas do complexo I oxidam o NADH, e os electrões produzidos reduzem o substrato artificial decilubiquinona que subsequentemente liberta electrões para o DCIP. A redução do DCIP pode ser medida espectrometricamente a 600nm. Como os electrões produzidos por outras NADH-dehidrogenase não são aceites pela decilubiquinona, a redução do DCIP é

completamente causada pela actividade do complexo I (Janssen, Trijbels et al. 2007). Os resultados foram relativizados à quantidade de proteína mitocondrial e à quantidade de mtDNA, sendo expressos em $\mu\text{mol/g}$ (U/g) de proteína e $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ de mtDNA.

A actividade específica do complexo II foi determinada de acordo com Birch-Machin *et al.* (1994). Resumidamente, a actividade do complexo II foi determinada pela redução do DCIP a 600nm ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 2 minutos. As mitocôndrias foram pré-incubadas num tampão contendo 25mM de fosfato de potássio (pH de 7.2), 5mM de MgCl_2 e 20mM de succinato a 30°C durante 10 minutos. Anticimina A (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rotenona, 2mM de KCN e 50 μM de DCIP foram adicionados e registou-se a variação de absorvância durante 3 minutos. A reacção foi iniciada com 65 μM de ubiquinona e leu-se novamente a absorvância a 600nm durante mais 3 minutos. Os dados foram relativizados à quantidade de proteína mitocondrial e à quantidade de mtDNA, sendo expressos em nmol/min/mg de proteína e nmol/min/ μg de mtDNA.

A actividade específica do citocromo c oxidase (complexo IV) foi medida pela oxidação do citocromo c (II), a 550 nm ($\epsilon = 19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 30 segundos. O tampão de reacção continha 20mM de tampão fosfato pH 7.0 e 15 μM de citocromo c (II) (Birch-Machin, Briggs et al. 1994). Uma vez que o citocromo c disponível comercialmente só existe na forma oxidada, procedeu-se à redução deste pela adição de ascorbato, posteriormente separado por cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G25. Os resultados da actividade da citocromo c oxidase foram relativizados à quantidade de proteína mitocondrial e à quantidade de mtDNA, sendo expressos em nmol/min/mg de proteína e nmol/min/ μg de mtDNA.

A actividade da ATP sintetase (complexo V) foi determinada de acordo com Simon *et al.* (2003). Em resumo, as mitocôndrias foram incubadas num tampão de reacção (10mM de Tris-HCl, 3mM de MgCl_2 , 0.2M de KCl pH 8.4) com ou sem oligomicina durante 2 minutos após o que se adicionou 0.1M de ATP pH 7.0 durante 30 segundos. A reacção foi parada pela adição de 3M de TCA. Após centrifugação a 9000g durante 10 minutos a 4°C retirou-se o sobrenadante e incubou-se com uma solução teste (3.3g de molibdato de amónio, 4g de sulfato ferroso em 500mL de 0.37M de ácido sulfúrico) durante 15 minutos. Seguidamente mediu-se a absorvância a 610nm. O fosfato produzido pela hidrólise do ATP reage com o molibdato de amónio na presença de agentes de redução para formar um complexo de cor azul cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato em solução. A oligomicina foi usada como um inibidor da actividade da ATPase. Paralelamente foram preparados padrões de fosfato inorgânico para a realização de uma curva padrão utilizada para determinar a quantidade de fosfato libertado pela hidrólise do

ATP. A actividade da ATP sintetase foi expressa em $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ de proteína ou em $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ de mtDNA.

5.Separação do citocromo c da fracção mitocondrial e do homogeneizado total do coração de ratinho por SDS-PAGE

5.1.Preparação das amostras

Atendendo à baixa concentração de proteína total nas amostras de homogeneizado total e da fracção mitocondrial, procedeu-se à precipitação da proteína das amostras. Assim, preparou-se uma solução de 50% de TCA e adicionou-se a um volume de amostra correspondente a $15\mu\text{g}$ de proteína de forma a que a concentração final de TCA seja 10%. Após uma incubação de 1h no gelo, centrifugaram-se as amostras a 14000rpm a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* adicionou-se 100% de etanol gelado e incubou-se a -20°C durante 2 horas ou durante a noite. Após uma centrifugação a 14000rpm a 4°C durante 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante e secaram-se as amostras na SpeedVac® Plus SC 210 A (Thermo Savant, USA). Ao *pellet* seco obtido adicionou-se tampão de redução (contendo 4% de SDS, 0,5M de Tris, pH de 6,8, 15% de glicerol, 20% de mercaptoetanol e azul bromofenol) e ferveram-se as amostras de forma a garantir a desnaturação total das proteínas. As amostras reduzidas foram depois aplicadas num gel SDS-PAGE como a seguir descrito.

5.2 Electroforese SDS-PAGE

Com a finalidade de separar as proteínas da fracção mitocondrial e do homogeneizado total para posterior avaliação das PTMs por LC-MS/MS ou para análise por western blotting, procedeu-se à separação electroforética de $15\mu\text{g}$ de proteína num gel SDS-PAGE a 15% preparado de acordo com Laemmli (1970). Para evitar as variações inter-gel inerentes à técnica, em cada gel foram aplicadas amostras de cada um dos grupos (GJ, GVA e GVS). Para a pesquisa de PTMs e no sentido de avaliar potenciais modificações induzidas pela técnica utilizada, aplicou-se também $5\mu\text{g}$ de citocromo c comercial (from horse heart, C -7752; Sigma) nos mesmos géis nos quais se aplicaram as amostras. Terminada a corrida, os géis foram corados com azul de coomassie coloidal ou procedeu-se à electrotransferência por western blotting.

5.2.1.Revelação dos géis com Azul de Coomassie Coloidal (G-250)

Para visualização das proteínas, os géis foram revelados com Azul de Coomassie Coloidal (G-250). Neste sentido, uma vez terminada a separação electroforética das proteínas, procedeu-se à fixação das bandas colocando os géis numa solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético em agitação durante 1 hora. Seguidamente, retirou-se a solução de fixação e colocou-se uma solução de Coomassie Coloidal G-250 (0,12% de G-250 em 20% de metanol) durante 12 horas. A descoloração efectuou-se através de várias lavagens utilizando uma solução de 25% de metanol, até à eliminação do ruído de fundo do gel. Finalmente, colocou-se o gel em água destilada o qual foi posteriormente digitalizado num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BioRad) e analisado com o software QuantityOne versão 4.6.3 (BioRad).

6.Western-blotting para determinação do teor de citocromo c e de nitração

As proteínas depois de separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman®, Protan®) num tampão de 25mM de Tris, 192mM de Glicina, pH de 8,3 e 20% de metanol, durante 2 horas a 200mA. Após o bloqueamento dos locais de ligação não específicos com uma solução de 5% de leite magro em pó em TBS-T (tampão de 100mM de Tris, pH de 8,0, com 1,5mM de NaCl e 0,5% de Tween 20) durante 5 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Para a detecção do citocromo c, as membranas foram incubadas durante duas horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C com anticorpo monoclonal anti-citocromo c (1:1000; mouse monoclonal IgG; BD Biosciences Pharmingen). Para a detecção da 3-nitrotirosina, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo anti-nitrotirosina (1:1000; mouse monoclonal IgG; Chemicon) durante duas horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Estes anticorpos foram preparados numa solução de 5% de leite magro em pó em TBS-T. Posteriormente, lavou-se as membranas com TBS-T com o intuito de retirar o anticorpo não ligado covalentemente e procedeu-se à incubação com anticorpo secundário monoclonal anti-mouse IgG peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech) diluído 1:1000 numa solução de 5% leite magro e pó em TBS-T, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens com TBS-T, as membranas foram tratadas com reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante, e expostas a um filme de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma). Depois de revelado o filme foi digitalizado num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (BioRad) e analisado com o software QuantityOne versão 4.6.3 (BioRad).

7. Western-blotting para determinação do teor de grupos carbonilos

Com base no protocolo descrito por Robinson *et al.* (1999), um determinado volume de homogeneizado total ou de fracção mitocondrial (1V) contendo 20µg de proteína foi derivatizado com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Assim, às amostras foi adicionado um volume (1V) de SDS 12% e dois volumes (2V) de DNPH 20mM preparada em TFA 10%, seguindo-se a sua incubação no escuro. Após este período, procedeu-se à neutralização com 1,5 volumes (1,5V) de 2M de Tris, 30% de glicerol e 18% de β-mercaptoetanol tendo-se aplicado 20µL da mistura obtida para cada amostra num gel de SDS-PAGE de 12.5%. As proteínas depois de separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman®, Protan®). A imunodeteção dos grupos carbonilo foi efectuada usando o anticorpo primário *rabbit polyclonal* anti-DNP (1:2000; Catálogo nº V0401; DakoCytomation) e o anticorpo secundário anti-*rabbit* IgG-Peroxidase (1:2000; Amersham Pharmacia Biotech). As bandas foram visualizadas por tratamento dos *immunoblots* com os reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL-Plus, Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante, seguida de exposição a filmes raio-X (Kodak Biomax Light Film, Sigma). Os filmes foram analisados com o software QuantityOne versão 4.6.3 (BioRad).

8. Identificação de proteínas do músculo cardíaco e caracterização das PTMs do citocromo c

8.1 Preparação das amostras para análise por espectrometria de massa

As bandas de proteínas foram cortadas dos géis SDS-PAGE e as proteínas foram digeridas em gel com tripsina. Em resumo, as porções de gel foram lavadas duas vezes com 25mM de bicarbonato de amónio/50% de acetonitrilo, seguida de uma lavagem com 100% de acetonitrilo com o objectivo de remover o corante e desidratar os pedaços de gel. As bandas foram então secas sob vácuo na SpeedVac® Plus SC 210 A (Thermo Savant, USA). Ao resíduo seco adicionou-se 21µL de tripsina porcina modificada (Catálogo nº V511A, Promega Corporation, USA) preparada em bicarbonato de amónio 25mM a uma concentração de 10µg/mL e após 1 hora a 37°C adicionou-se mais solução de 25mM bicarbonato de amónio de forma a cobrir todas as bandas, incubando-se durante a noite a 37°C. Os péptidos tripticos foram extraídos do gel com 10% de ácido fórmico e concentrados sob vácuo na SpeedVac® Plus SC 210 A (Thermo Savant, USA). Paralelamente, efectuou-se digestão de citocromo c comercial de coração de cavalo

(catálogo C-7752, Sigma) (1mg/mL) em solução com tripsina, durante 4 horas a 37°C. De seguida ressuspenderam-se os péptidos em 5% de acetonitrilo e 0,3% de TFA. Depois de uma centrifugação a 14000rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente, transferiu-se o sobrenadante para o porta-amstras para posterior separação dos péptidos por nano-HPLC.

8.2 Separação dos digestos trípticos por nano-HPLC

A separação dos péptidos por nano-HPLC foi executada no módulo de separação Ultimate 3000 (LC Packings) utilizando uma coluna capilar (C18 Zorbax SB 300; 0.75µm diâmetro interno; 15cm de comprimento). Utilizou-se um gradiente do solvente A, (Água/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (95:5:0.05, v/v/v)) para o solvente B (Água/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético (20:80:0.04, v/v/v)). Para a separação, injectaram-se 2µg/µL de amostra. A separação foi efectuada utilizando um gradiente linear (5-55% B, durante 30 minutos; 55-80% B, durante 10 minutos e 80-5% A, durante 5 minutos) com um caudal de 0.3µL/min. Os péptidos depois de eluírem da coluna capilar nanolítica foram aplicados directamente numa placa de MALDI em fracções de 20 segundos, utilizando um colector automático de fracções *Probot* (LcPackings) com adição de 270nL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (6mg/mL de matriz α-ciano-4-hidroxicinâmico preparada em 70% acetonitrilo e 0.3% de ácido trifluoroacético suplementada com 0.4µL de uma solução (15fmol) Glu-Fib), para posterior identificação e caracterização de citocromo c.

8.3. Identificação de proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF

Os espectros de massa dos péptidos, resultantes da digestão tríptica das proteínas, separados por nano-HPLC foram obtidos com um espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no modo reflectrão positivo e obtidos no intervalo de massas desde os 700-4500Da, com 1000 tiros de laser. Foi criado um método de aquisição de dados para seleccionar os dez picos mais intensos em cada spot para posterior aquisição de espectros de MS/MS, excluindo os picos da matriz, devidos à autólise da tripsina ou da acrilamida. O pico correspondente ao padrão interno Glu-Fib (m/z 1570.68Da) foi utilizado como calibrante interno do aparelho. Os espectros foram processados e analisados pela *Global Protein Server (GPS) Workstation* (Applied Biosystems), que usa como motor de busca o Mascot (Matrix Science, London, UK) para a identificação de proteínas conjugando os dados de PMF (*peptide mass fingerprinting*) com os dados de MS/MS (*peptide fragment*

fingerprinting) para pesquisa numa base de dados interna. A identificação da proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 98%.

8.4. Identificação e confirmação das modificações oxidativas por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF

Os espectros de MS/MS foram mais uma vez processados pelo *Global Protein Server Workstation* (Applied Biosystems) considerando como modificações variáveis as modificações oxidativas listadas na base de dados UNIMOD (www.unimod.org) e apresentadas na tabela 6. Rejeitaram-se as identificações que excediam os desvios de ± 40 ppm e $\pm 0,3$ Da, sendo as restantes confirmadas manualmente na aplicação DeNovo Explorer versão 3.6 (Applied Biosystems).

8.5 Estudo *in vitro* das PTMs do citocromo c de coração de cavalo

Paralelamente, procedeu-se à caracterização das PTMs do citocromo c *in vitro* e nesse sentido induziu-se a oxidação do citocromo c de coração de cavalo (catálogo C-7752, Sigma) segundo a reacção de Fenton. Neste sentido, incubou-se 5mg/mL de citocromo c com 10mM de tampão fosfato (pH de 7,4), 500 μ M de solução de FeCl₂ e 9,8M de H₂O₂ a 37°C, durante 4 horas, na proporção final 1:2:1 (citocromo c: FeCl₂: H₂O₂).

Para identificar e caracterizar os resíduos modificados por MALDI-TOF/TOF, efectuou-se a digestão do citocromo c oxidado em solução com tripsina, durante 4 horas a 37°C. A caracterização das PTMs nos digestos tripticos foi realizada de acordo com o descrito nos pontos 7.3 e 7.4.

Tabela 2: Modificações oxidativas listadas na UNIMOD Web site que foram pesquisas com *Global Protein Server*.

Modificação	Descrição	Desvio de Massa (Da) (monoisotópica)
Amino (Tyr)	Oxidação da Tirosina a 2-aminotirosina	+15.0108
Arg->GluSA	Oxidação da Arginina a semialdeído glutâmico	-43.0534
Carbamilação (Lys, Arg, Cys, Met)	Reacção do Isocianato com grupos amina	+43.0058
Carboxi (Lys, Asp, Glu)	Carboxilação	+43.9898
Cys->oxoalanina	Oxidação da Cisteína a oxoalanina	-17.9928
Deamidação (Arg, Asn, Gln)	Deamidação	0.9840
His->Asn	Oxidação da Histidina a asparagina	-23.0159
His->Asp	Oxidação da Histidine a ácido aspártico	-22.0319
Lys->Alisina	Oxidação da Lisina a semialdeído aminoadípico	-1.0316
Lys-> Acido aminoadípico	Oxidação da Lisina a ácido α -aminoadípico	+14.9632
Oxidação and dioxidação (Lys, Arg, Cys, Met, Tyr, His, Pro, Trp, Phe, Asp, Asn)	Adição de oxigénio e hidroxilação	+15.9949 +31.9898
Pro->Pyro-Glu	Oxidação da Prolina a ácido piroglutâmico	+13.9792
Pro->Pirrolidinona	Oxidação da Prolina a pirrolidinona	-30.0105
Pro->Pirrolidona	Oxidação da Prolina a pirrolidona	-27.9949
Quinona (Tyr)	Quinona	+29.9741
Trioxidação (Cys)	Oxidação da Cisteína a ácido cisteico	+47.9847
Trp->Hidroxiquinurenina	Oxidação do Triptofano a hidroxiquinurenina	+19.9898
Trp->Quinurenina	Oxidação do Triptofano a Quinurenina	+3.9949
Trp->Oxolactona	Oxidação do Triptofano a oxolactona	+13.9792
Tyr->TyrN	Tirosina a nitrenotirosina	+12,99525
Tyr->TyrNO	Tirosina a nitrosotirosina	+28,9902
Tyr->TyrNO ₂	Tirosina a nitrotirosina	+44,9851

9. Análise Estatística

Todas as variáveis analisadas apresentaram uma distribuição normal, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Por essa razão, todos os resultados deste trabalho foram processados recorrendo aos testes estatísticos paramétricos. A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis de cada um dos grupos experimentais. Para testar a diferenças entre estes grupos experimentais efectuou-se uma análise de variância multifactorial one-way ANOVA seguida da aplicação do teste *Tukey post-hoc* de comparação múltipla. O cálculo dos dados foi efectuado com o *software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 15.0. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

IV.Resultados

A - Estudo da influência do estilo de vida na plasticidade muscular cardíaca

1.Efeito do exercício físico ao longo da vida na plasticidade mitocondrial cardíaca

Para avaliar o efeito do estilo de vida na adaptação cardíaca associada ao envelhecimento determinou-se o rácio massa do coração/massa corporal. Pela análise da tabela 3 verifica-se que com a idade ocorre um aumento estatisticamente significativo da relação massa de coração/massa corporal, sugestiva de hipertrofia cardíaca, mais evidente nos animais velhos activos (39% mais elevada do que nos ratinhos jovens). Neste grupo experimental, observou-se uma menor massa corporal mas uma maior massa do coração do que nos ratinhos velhos sedentários, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do envelhecimento e do exercício físico na massa corporal do ratinho, na massa do coração e na relação massa de coração/massa corporal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupo experimental	GJ	GVA	GVS
Massa corporal (g)		27,08 \pm 1,08	33,34 \pm 2,15** [‡]	36,27 \pm 4,06*
Massa do coração (mg)		121,14 \pm 7,90	210,57 \pm 12,84** [‡]	187,71 \pm 18,14**
Relação massa coração/massa corporal (mg/g)		4,473 \pm 0,21	6,213 \pm 0,331** [‡]	5,223 \pm 0,675 [#]

** $p < 0,001$ vs GJ; [‡] $p < 0,05$ GVA vs GVS; * $p < 0,01$ GJ vs GVS; [#] $p < 0,05$ vs GJ

Após o isolamento das mitocôndrias cardíacas dos ratinhos dos vários grupos experimentais determinou-se a concentração de proteína total e de mtDNA e relacionou-se estes parâmetros entre si e com a massa do órgão (Tabela 4). A razão mtDNA/massa de coração constitui um indicador grosseiro do número de mitocôndrias no tecido. Como se pode constatar pela análise da tabela 4, não se observaram diferenças estatisticamente significativas deste parâmetro entre os grupos experimentais. Uma variação semelhante foi observada para o parâmetro concentração de proteína total/massa de coração. Relativamente ao rácio mtDNA/proteína mitocondrial, observaram-se valores mais elevados nos ratinhos jovens do que nos velhos e entre estes, maior nos sedentários do que nos activos (Tabela 4).

Tabela 4: Efeitos do envelhecimento e do exercício físico ao longo da vida na concentração de proteína mitocondrial e concentração de mtDNA. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupo experimental	GJ	GVA	GVS
Concentração de Proteína mitocondrial (mg/mL)		0,36 \pm 0,07	0,85 \pm 0,30*	0,70 \pm 0,22 [#]
mtDNA (μ g/mL)		1,79 \pm 0,64	2,93 \pm 1,00	2,94 \pm 1,27
mtDNA/massa de coração (μ g/g)		3,67 \pm 1,24	3,48 \pm 1,25	3,84 \pm 1,34
Proteína/massa coração (μ g/g)		711 \pm 113	1063,6 \pm 314	1111,9 \pm 227
mtDNA/Proteína mitocondrial (μ g/mg)		4,97 \pm 1,63	3,53 \pm 0,94	4,53 \pm 1,95

[#]p<0,05 vs GJ; * p<0,01 vs GJ

2.Avaliação da actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

Com o intuito de avaliar o efeito do envelhecimento e do estilo de vida na funcionalidade mitocondrial, determinou-se espectrofotometricamente a actividade dos complexos da cadeia respiratória I, II, IV e V nos extractos de mitocôndrias dos vários grupos experimentais utilizando-se para o efeito substratos específicos para cada um dos complexos analisados. Da análise da figura 10 pode-se constatar que, quando os dados são relativizados à quantidade de proteína, apenas se observaram diferenças de actividade estatisticamente significativas para os complexos II e V sendo maior no GJ.

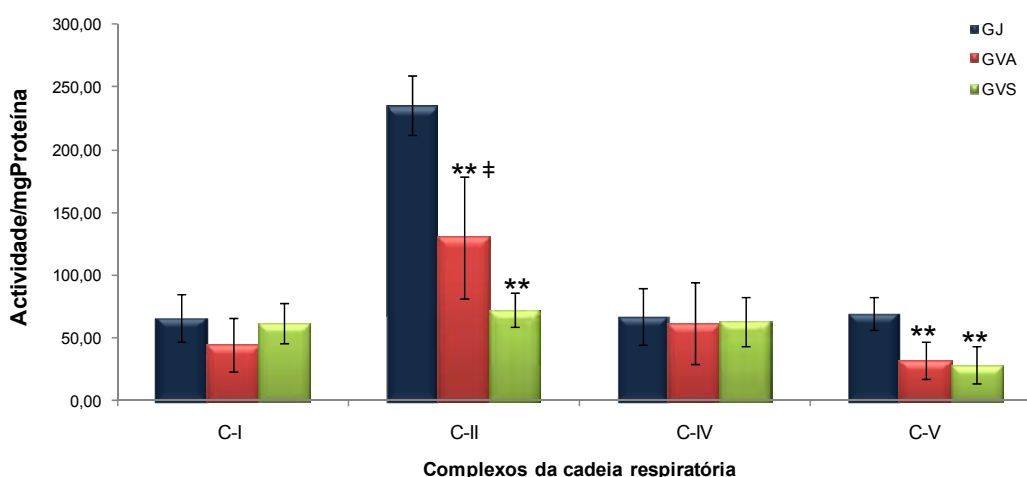


Figura 10: Efeitos do envelhecimento e do exercício na actividade da NADH-ubiquinona oxidoreductase (C-I; U/g proteína), succinato-ubiquinona oxidoreductase (C-II; nmol/min/mg proteína), da citocromo c oxidase (C-IV; nmol/min/mg proteína) e da ATP sintetase (C-V; nmol Pi/min/mg proteína). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

** $p < 0,001$ vs GJ; $\# p < 0,01$ GVA vs GVS.

Assim, verificou-se que a actividade do complexo succinato-ubiquinona oxidoreductase diminui com o envelhecimento, sendo esse declínio de 37,5% e 41% para os GVA e GVS, respectivamente. Relativamente ao complexo II, verificou-se ainda que os animais velhos activos apresentaram valores de actividade significativamente maiores (44%) do que os animais velhos sedentários. No que diz respeito à actividade do ATP sintetase observou-se uma diminuição com o envelhecimento de 53,7% e 58,8% para os GVA e GVS, respectivamente (Figura 10).

Quando a actividade dos complexos da cadeia respiratória foi relativizada ao teor de mtDNA o perfil observado para os diferentes grupos experimentais (Figura 11) diferiu do apresentado na figura 10 para alguns dos complexos analisados. No que concerne à actividade da NADH-ubiquinona oxidoreductase verificou-se uma diminuição tendencial da actividade com o avanço da idade, sendo esta diminuição estatisticamente significativa para os animais velhos sedentários (37,1%). Para os animais velhos activos não se observaram diferenças estatisticamente significativas quando comparando com os ratinhos jovens (Figura 11).

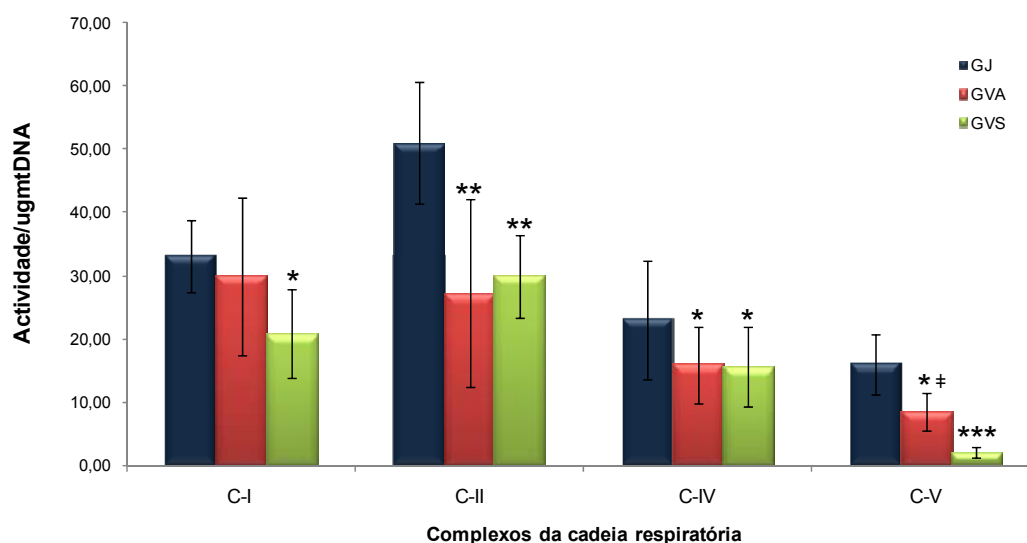


Figura 11: Efeitos do envelhecimento e do exercício na actividade da NADH-ubiquinona oxidoreductase (C-I; U/μg mtDNA), succinato-ubiquinona oxidoreductase (C-II; nmol/min/μg mtDNA), da citocromo c oxidase (C-IV; nmol/min/μg mtDNA) e da ATP sintetase (C-V; nmol Pi/min/μg mtDNA). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

* $p < 0,05$ vs GJ; *** $p < 0,001$ vs GJ; ** $p < 0,0001$ vs GJ; † $p < 0,01$ GVA vs GVS.

Relativamente à actividade da succinato-ubiquinona oxidoreductase, os animais velhos, quer activos quer sedentários, apresentaram valores de actividade semelhantes entre si e inferiores aos animais jovens, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Neste sentido, verificou-se uma diminuição da actividade com o envelhecimento de 46,6% e 41,2% para o GVA e GVS, respectivamente. Relativamente à actividade da citocromo c oxidase observaram-se diferenças estatisticamente significativas dependentes da idade dos ratinhos. Assim, verificou-se que a actividade deste complexo diminui com o avanço da idade, sendo esta diminuição de 31,0% e 32,3% para os animais velhos activos e animais velhos sedentários, respectivamente. Não se detectaram diferenças estatisticamente significativas da actividade do citocromo c oxidase relacionadas com a prática de exercício físico ao longo da vida. Pela análise da figura 9 pode-se ainda verificar que a actividade da ATP sintetase é significativamente maior nos animais jovens, como já observado na figura 8, e de entre os animais velhos, os activos apresentaram uma actividade maior deste complexo da cadeia respiratória do que os animais sedentários (aumento de 76,8%) (Figura 11), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Verificou-se assim, que a actividade da ATP sintetase diminui 46,4% e 87,5% para o GVA e GVS, respectivamente.

3.Efeito do envelhecimento e da prática de exercício físico ao longo da vida na expressão de citocromo c cardíaco

Para avaliar o efeito do envelhecimento e da prática de exercício físico moderado ao longo da vida no perfil de proteínas mitocondriais, mediu-se o teor de citocromo c na fracção mitocondrial (Figura 12) e no homogeneizado total (Figura 13) utilizando-se para o efeito a técnica de Western-Blotting com um anticorpo monoclonal específico.

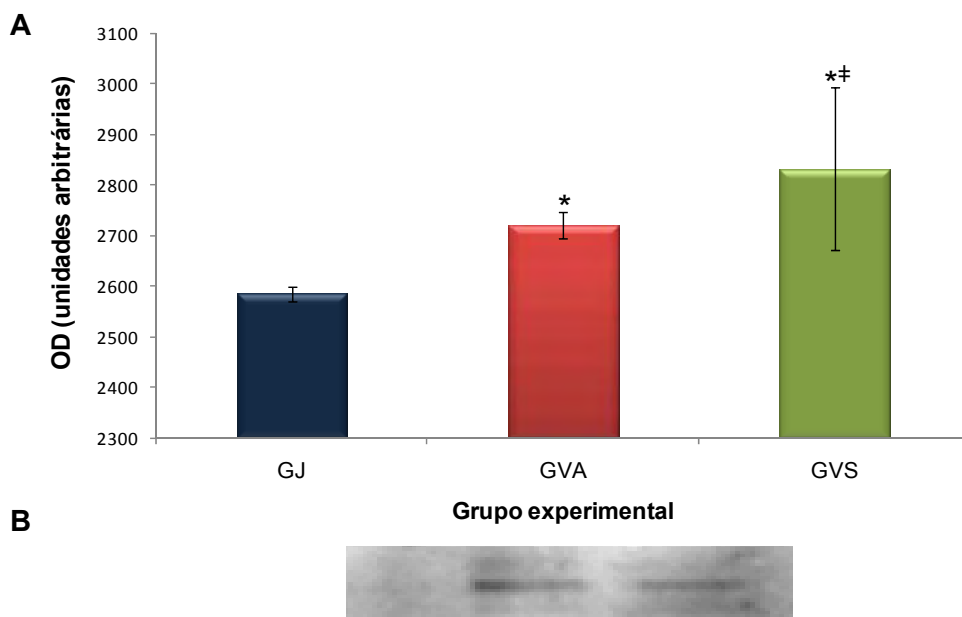


Figura 12: **A** – Efeitos do envelhecimento e exercício físico na expressão do citocromo c mitocondrial. **B** – Imagem representativa do Western-blotting. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD).

* $p < 0,05$ GVA vs GJ; ** $p < 0,001$ GVS vs GJ; † $p < 0,05$ GVS vs GVA.

Pela análise da figura 12 pode constatar-se que os grupos de animais velhos, quer activos quer sedentários, apresentaram valores de expressão de citocromo c mitocondrial mais elevados do que os animais jovens, sendo este aumento estatisticamente significativo. No que se refere aos animais velhos, verificou-se que os ratinhos sedentários apresentam maior expressão de citocromo c mitocondrial do que os animais activos, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Figura 12).

Quando a expressão do citocromo c foi avaliada no homogeneizado total (Figura 13) verificou-se, à semelhança do constatado na fracção mitocondrial, um aumento significativo da expressão desta proteína com o avanço da idade. Não se detectaram diferenças significativas da expressão do citocromo c entre os animais velhos activos e os animais velhos sedentários.

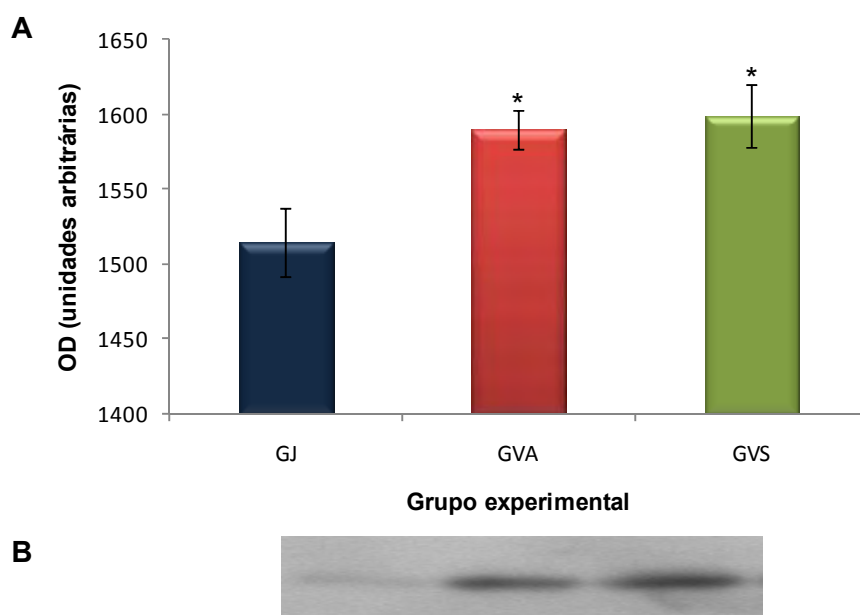


Figura 13: **A** – Efeito do envelhecimento e do exercício físico na expressão do citocromo c no homogeneizado total. **B** – Imagem representativa do Western-blotting. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD).

** $p < 0,001$ Vs GJ.

4.Efeito do envelhecimento e do exercício físico na susceptibilidade das proteínas do coração à carbonilação e nitração

Para avaliar os níveis de oxidação de proteínas do coração de ratinho nos três grupos experimentais determinou-se o teor total de carbonilação por Western-blotting após uma derivatização prévia dos grupos carbonilo com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Adicionalmente, identificaram-se as proteínas do coração de ratinho mais afectadas pela carbonilação, analisando-se para o efeito o homogeneizado total, e pesquisaram-se ainda as proteínas mitocondriais mais susceptíveis à oxidação. Da análise do homogeneizado total do coração de ratinho verificou-se que o teor de proteínas carboniladas aumentou significativamente nos animais velhos em relação aos animais jovens, como podemos observar na figura 14. Em relação aos ratinhos velhos observou-se que nos animais velhos activos o teor de proteínas carboniladas aumentou significativamente quando comparado com os ratinhos velhos sedentários (Figura 14).

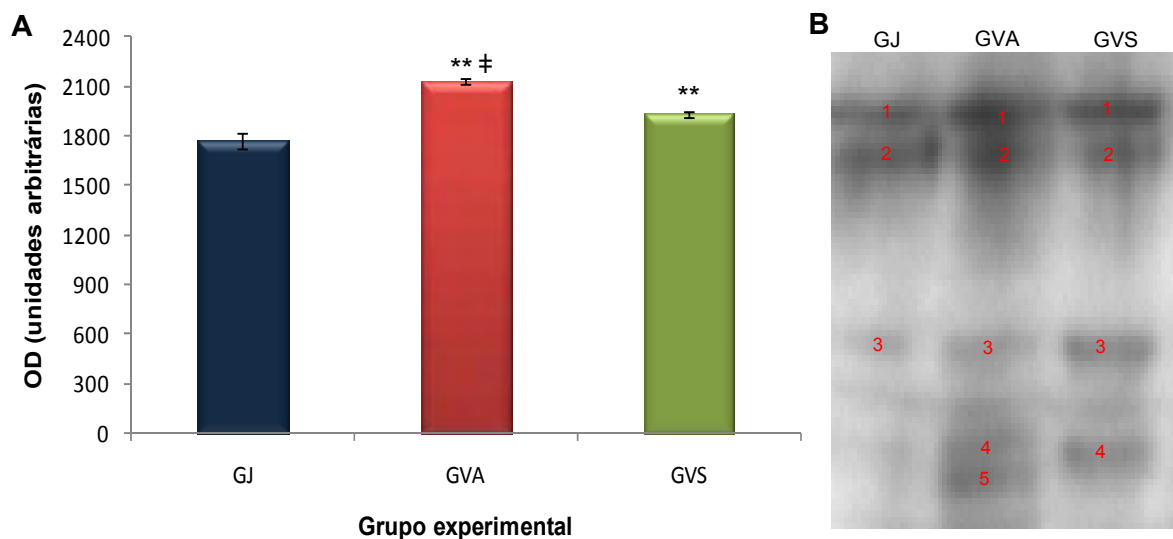


Figura 14: **A** – Efeito do envelhecimento e do exercício físico no teor total de carbonilação das proteínas cardíacas. **B** – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD).

** $p < 0,001$ vs GJ; [‡] $p < 0,001$ GVA vs GVS.

Como podemos observar pela análise da figura 15, o teor de grupos carbonilos na fracção mitocondrial aumentou significativamente com o envelhecimento, tanto nos ratinhos activos como nos ratinhos sedentários, não se tendo observado diferenças significativas entre estes.

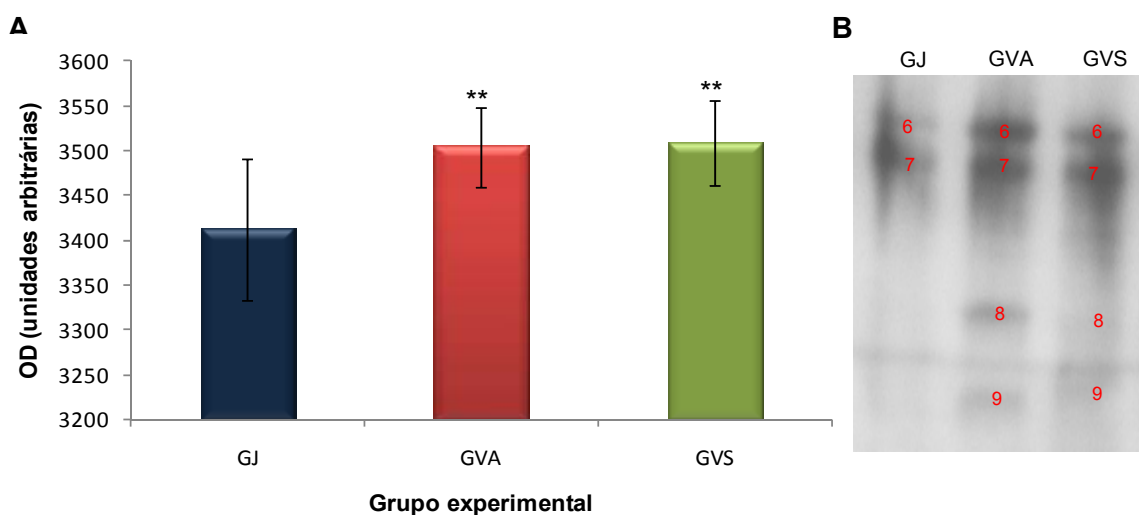


Figura 15: **A** – Efeito do envelhecimento e do exercício físico no teor total de grupos carbonilos na fracção mitocondrial. **B** – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD).

** $p < 0,01$ Vs GJ.

Da análise dos filmes de western-blotting obtidos pode-se ainda constatar que as diferenças entre os vários grupos experimentais são não só quantitativas como também qualitativas, tanto quando se analisa o músculo cardíaco em geral como a fracção mitocondrial em particular (Figura 14B e 15B). O padrão de bandas marcadas pelo anticorpo anti-DNP é semelhante para as proteínas de maior massa molecular entre os diferentes grupos experimentais. No entanto, na zona de menor massa molecular observaram-se algumas diferenças. Relativamente ao homogeneizado total, no GJ não se detectou a banda 4 e 5 marcada pelo anticorpo anti-DNP e no GVS apenas a banda 4 aparece marcada (Figura 14B). Na fracção mitocondrial (Figura 15B) não se detectou reactividade ao anticorpo anti-DNP nas bandas 8 e 9 no GJ.

No sentido de pesquisar as principais proteínas alvo à oxidação, procedeu-se à identificação por espectrometria de massa das proteínas presentes nas bandas do gel de SDS-PAGE correspondentes às proteínas marcadas pelo anticorpo anti-DNP. Na tabela 5 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 5: Proteínas identificadas nas bandas do gel de SDS-PAGE correspondentes às bandas carboniladas após análise por Western-blotting no homogeneizado total e na fracção mitocondrial (para um *Protein score* superior a 95%).

Banda	Nome	Nome de acesso	PM	pl	Número de péptidos	Grupo experimental
Homogeneizado total	ATP sintetase subunidade alfa, mitocondrial	ATPA_MOUSE	59715,59	9,22	17	GJ GVA GVS
	1 Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	6	
	ATP sintetase subunidade beta, mitocondrial	ATPB_MOUSE	56318,48	5,19	13	
	<i>Strumpellin</i>	STRUM_MOUSE	134024,81	6,72	19	
	2 Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	1	GJ GVA GVS
	3 Complexo citocromo b-c1 subunidade 1,	QCR1_MOUSE	52735,43	5,75	11	GJ GVA GVS
	Creatina Quinase, sarcomérica mitocondrial	KCRS_MOUSE	47443,32	8,64	11	GVA GVS
	4 <i>Ras-related protein Rab-21</i>	RAB21_MOUSE	24091,15	8,11	10	
	Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	4	GVA
	5 Miosina-6	MYH6_MOUSE	223426,47	5,57	24	
Fracção mitocondrial	Miosina-7	MYH7_MOUSE	222740,52	5,59	20	GJ GVA GVS
	6 Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	17	
	7 Isocitrato desidrogenase [NADP], mitocondrial	IDHP_MOUSE	50873,94	8,88	9	
	8 Malato desidrogenase, mitocondrial	MDHM_MOUSE	35660,81	8,93	10	GVA GVS
	Creatina Quinase, sarcomérica mitocondrial	KCRS_MOUSE	47355,30	8,76	8	
	9 Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	5	GVA GVS
	NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 2, mitocondrial	NDUV2_MOUSE	27267,90	7,00	3	
	Citocromo c oxidase subunidade 2	COX2_MOUSE	25922,04	4,6	3	

Da análise da tabela 5 é possível constatar que, de um modo geral, as proteínas mais susceptíveis à carbonilação são proteínas metabólicas ou do OXPHOS. A comparação dos grupos experimentais evidencia que, no homogeneizado total, no GVA as proteínas estruturais são mais susceptíveis à carbonilação do que nos grupos GJ e GVS. A malato desidrogenase, a creatina quinase e subunidades particulares da NADH

desidrogenase e da citocromo c oxidase parecem ser mais susceptíveis à oxidação nos ratinhos velhos. Ainda, pela análise da tabela 5 é também evidente que a albumina sérica constitui um alvo preferencial do dano oxidativo.

No sentido de avaliar a extensão da nitração das proteínas do músculo cardíaco, mediu-se o teor de 3-nitrotirosina no homogeneizado de músculo cardíaco e na fracção mitocondrial. Adicionalmente, identificaram-se as proteínas mais susceptíveis à nitração por MALDI-TOF/TOF. Da análise do músculo cardíaco, numa perspectiva geral, pode-se constatar que o teor de 3-nitrotirosina aumenta significativamente com o envelhecimento, tanto para os animais sedentários como para os activos, não existindo diferenças significativas entre os diferentes grupos de animais velhos (Figura 16).

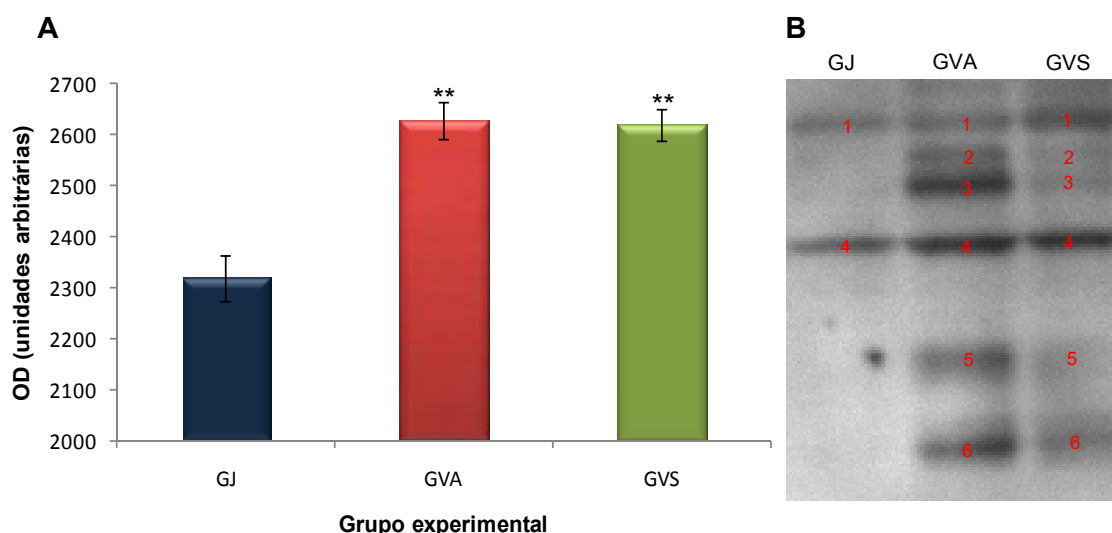


Figura 16: A - Efeitos do envelhecimento e do exercício físico no teor de 3-nitrotirosina no músculo cardíaco. **B** – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD).

** $p < 0,001$ vs GJ.

Em relação à fracção mitocondrial observou-se que nos ratinhos velhos sedentários o teor de 3-nitrotirosina aumentou significativamente quando comparado com os ratinhos jovens e velhos activos, como se pode verificar na figura 17. Não se observaram diferenças significativas entre os animais jovens e os velhos activos.

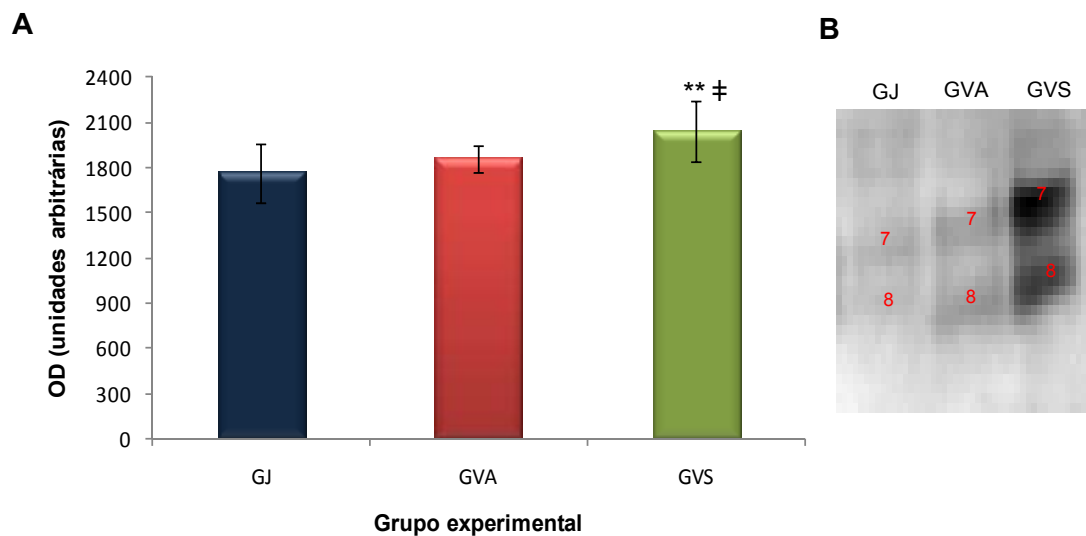


Figura 17: **A** - Efeitos do envelhecimento e do exercício físico no teor de 3-nitrotirosina na fracção mitocondrial. **B** – Imagem representativa do Western-blotting para cada grupo experimental. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de Densidade óptica (OD).

** $p < 0,001$ GVS vs GJ; ‡ $p < 0,05$ GVS vs GVA.

A análise do padrão de nitração (Figuras 16B e 17B) sugere que a susceptibilidade das proteínas do músculo cardíaco à nitração é dependente da idade e do estilo de vida. Efectivamente, da análise dos Western-blots obtidos (Figura 16B) verifica-se que as bandas 2, 3, 5 e 6 só se encontram marcadas pelo anticorpo anti-3-nitrotirosina nos animais velhos, encontrando-se mais intensas nos animais velhos activos. Na fracção mitocondrial, as diferenças entre os grupos experimentais são sobretudo quantitativas, observando-se apenas duas bandas com proteínas nitradas (Figura 17B).

No sentido de averiguar quais as proteínas alvo à nitração, identificou-se por MS as proteínas presentes nas bandas do gel de SDS-PAGE correspondentes às bandas marcadas na análise por western-blotting com anti-3-nitrotirosina. As proteínas identificadas por espectrometria de massa encontram-se listadas na tabela 6.

Tabela 6: Proteínas identificadas nas bandas do gel de SDS-PAGE correspondentes às bandas positivamente marcadas com anti-3-nitrotirosina após análise por Western-blotting no homogeneizado de músculo cardíaco e na fracção mitocondrial (para um *Protein score* superior a 95%).

Banda	Nome	Nome de acesso	PM	pI	Número de péptidos	Grupo experimental	
1	ATP sintetase subunidade alfa, mitocondrial	ATPA_MOUSE	59715,59	9,22	17	GJ GVA GVS	
	Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	6		
	ATP sintetase subunidade beta, mitocondrial	ATPB_MOUSE	56318,48	5,19	13		
	<i>Strumpellin</i>	STRUM_MOUSE	134024,81	6,72	19		
Homogeneizado total	2	Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,711	5,75	6	GVA GVS
	3	Creatina Quinase, sarcomérica mitocondrial	KCRS_MOUSE	47443,32	8,64	11	GVA GVS
		<i>Ras-related protein Rab-21</i>	RAB21_MOUSE	24091,15	8,11	10	
		Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	4	
	4	Complexo citocromo b-c1 subunidade 1	QCR1_MOUSE	52735,43	5,75	11	GJ GVA GVS
	5	Actina, alfa músculo cardíaco 1	ACTC_MOUSE	41991,88	5,23	14	GVA GVS
		Actina, citoplasmática 1	ACTB_MOUSE	41691,76	5,29	8	
	6	ATP sintetase subunidade O	ATPO_MOUSE	23348,74	10	7	GVA GVS
		Citocromo c oxidase subunidade 2	COX2_MOUSE	25872,84	4,49	4	
	Fracção mitocondrial	Albumina sérica	ALBU_MOUSE	68647,71	5,75	5	
7		NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 2, mitocondrial	NDUV2_MOUSE	27267,90	7	3	GVA GVS
		Citocromo c oxidase subunidade 2	COX2_MOUSE	25922,04	4,6	3	
8		Acil-coenzima A oxidase 1 peroxissomal	ACOX1_MOUSE	74587,24	8,64	10	GJ GVA GVS

À semelhança do observado para a carbonilação, entre as proteínas susceptíveis à nitração encontram-se essencialmente proteínas da OXPHOS. Inclusivamente, muitas das proteínas identificadas como potenciais alvo à carbonilação também parecem ser susceptíveis à nitração. No homogeneizado total também se identificaram diferentes isoformas de actina como proteína alvo da nitração. Na fracção mitocondrial, identificou-se entre as potenciais proteína alvo à nitração, uma enzima do metabolismo de ácidos gordos.

B - PTMs do citocromo c cardíaco

1. Identificação e caracterização das PTMs do citocromo c cardíaco

Com o intuito de identificar e caracterizar por espectrometria de massa as PTMs presentes no citocromo c cardíaco, pesquisaram-se as modificações listadas na tabela 2. A caracterização das PTMs desta pequena proteína foi feita após um estudo *in vitro* em que se induziu a sua oxidação tendo por base a reacção de Fenton e, paralelamente, estudaram-se as PTMs que ocorrem no citocromo c *in vivo*.

1.1 Estudo *in vitro* das PTMs do citocromo c cardíaco

No sentido de avaliar a susceptibilidade do citocromo c à oxidação, induziu-se *in vitro* a oxidação desta proteína. Para o efeito utilizou-se o citocromo c de coração de cavalo (C-7752, *Sigma*) uma vez que não se encontra comercialmente disponível o citocromo c de coração de ratinho ou de rato. No entanto, a sequência primária desta proteína apresenta uma homologia significativa (aproximadamente 94%) entre estas duas espécies animais (Figura 18).

Cavalo	MG ¹ DVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAPGFTYTDA ⁵⁰ NK
Ratinho	MG ¹ DVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAAGFSYTDA ⁵⁰ NK
Cavalo	NKGITWKEETLMEYLENPKKYIPGTKM ⁸⁰ IFAGIKKKTEREDLIAYLKATNE ¹⁰⁴
Ratinho	NKGITWGEDTLMEYLENPKKYIPGTKM ⁸⁰ IFAGIKKKGERADLIAYLKATNE ¹⁰⁴

Figura 18: Alinhamento da sequência primária do citocromo c de *Equus caballus* (P0004) e de *Mus musculus* (P62897).

(■ Resíduos conservados entre estas espécies; □ Resíduos não conservados entre estas espécies). (<http://services.uniprot.org>).

A oxidação do citocromo c foi induzida com $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ durante 4 horas a 37°C. A análise de MALDI-TOF/TOF demonstrou que o citocromo c, quando sujeito à oxidação com $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ apresenta 18 péptidos modificados, como podemos observar pela figura 19.

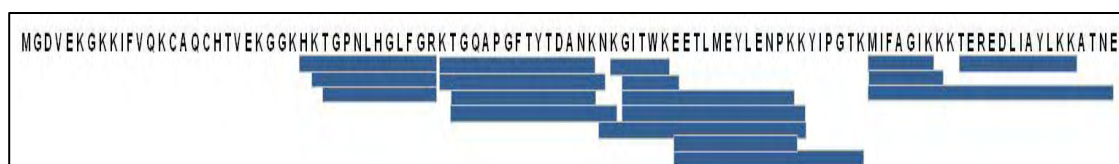


Figura 19: Representação esquemática dos péptidos modificados pelo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ e localização na estrutura primária do citocromo c de coração de cavalo.

(■ Péptidos modificados).

Com o intuito de identificar com precisão quais as PTMs presentes no citocromo c de coração de cavalo e qual o resíduo de aminoácido modificado, pesquisou-se no *Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems)* as PTMs apresentadas na tabela 2. Detectaram-se os iões com valor de m/z correspondentes às modificações oxidativas que foram posteriormente confirmadas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS). Foram analisados 450 espectros de MS/MS, resultando na confirmação de 35 PTMs, que afectam 23 resíduos de aminoácidos. Na tabela 7, é apresentada a lista todos os péptidos modificados, bem como o tipo de modificação e localização dos resíduos modificados na estrutura primária.

Tabela 7: Lista das modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados correspondem aos modificados).

Sequência peptídica	Massa calculada	Massa observada	Modificação
<u>H</u> ²⁶ <u>K</u> TGPNLHGLFGR ³⁸	1449,7710	1449,7501	Hidroxilação Pro ³⁰
	1449,7710	1449,7501	Oxidação His ²⁶
	1449,7710	1449,7501	Oxidação Lys ²⁷
<u>K</u> ²⁷ TGPNLHGLFGR ³⁸	1311,6804	1311,6451	Lys ²⁷ -> ácido aminoadípico
<u>T</u> ²⁸ G <u>P</u> NLHGLFGR ³⁸	1184,6171	1184,5873	Hidroxilação Leu ³²
	1184,6171	1184,5869	Hidroxilação Pro ³⁰
	1184,6171	1184,5869	Oxidação His ³³
	1184,6171	1184,5869	Oxidação Asn ³¹
	1138,6116	1138,5841	Pro ³⁰ -> Pirrolidona
<u>K</u> ³⁹ TGQAPGFTY <u>T</u> DANK ⁵³	1614,7759	1614,7626	Hidroxilação Tyr ⁴⁸
	1613,7441	1613,7084	Lys ³⁹ -> ácido aminoadípico
	1614,7759	1614,7626	Oxidação Asp ⁵⁰
<u>K</u> ³⁹ TGQAPG <u>F</u> TYTDANKNK ⁵⁵	1854,8981	1854,8855	Pro-> Piro-Glu 44
<u>T</u> ⁴⁰ GQAPG <u>F</u> TYTDANK ⁵³	1534,6656	1534,6722	Dioxidação Pro ⁴⁴ , Dioxidação Phe ⁴⁶
	1486,6809	1486,6472	Hidroxilação Pro ⁴⁴
	1486,6809	1486,6832	Hidroxilação Tyr ⁴⁸
	1486,6809	1486,6399	Oxidação Tyr ⁴⁸
<u>T</u> ⁴⁰ GQAPGFTYTDANKNK ⁵⁵	1726,8031	1726,8376	Pro-> Piro-Glu 44
<u>N</u> ⁵⁴ <u>K</u> GIT <u>W</u> KEETLMEYLENPKK ⁷³	2483,2485	2483,2361	Dioxidação Trp ⁵⁹
	2483,2485	2483,2361	Oxidação Lys ⁵⁵ , Oxidação Asn ⁵⁴
<u>K</u> ⁵⁵ GIT <u>W</u> K ⁶⁰	764,4301	764,4466	Dioxidação Trp ⁵⁹
<u>G</u> ⁵⁶ IT <u>W</u> KE ⁶¹	749,3828	749,3984	Oxidação Trp ⁵⁹
	749,3828	749,3984	Oxidação Lys ⁶⁰
<u>G</u> ⁵⁶ IT <u>W</u> KEETLMEYLENPK ⁷²	2097,0210	2096,9902	Oxidação Trp-59
	2097,0210	2097,0049	Oxidação Met-65
	2095,0051	2094,9727	Trp ⁵⁹ -> oxolactona

Continuação da Tabela 7.

Sequência peptídica	Massa calculado	Massa observada	Modificação
G⁵⁶ITWKEETLMEYLENPKK⁷³	2241,1108	2241,1179	Dioxidação Met ⁶⁵
	2241,1108	2241,0996	Dioxidação Trp ⁵⁹
	2241,1108	2241,1272	Formilquinurenina Trp ⁵⁹
	2228,0791	2228,1184	Formilquinurenina Trp ⁵⁹ , Hidroxilação Leu ⁶⁴
	2225,1157	2225,104	Hidroxilação Leu ⁶⁴
	2225,1157	2225,0793	Oxidação Trp ⁵⁹
	2223,1001	2223,0959	Trp ⁵⁹ -> Oxolactona
E⁶¹ETLMEYLENPK⁷²	1511,6934	1511,6941	Hidroxilação Leu ⁶⁴
	1511,6934	1511,6614	Hidroxilação Tyr ⁶⁷
	1511,6934	1511,6497	Oxidação Met ⁶⁵
	1511,6934	1511,6614	Oxidação Tyr ⁶⁷
E⁶¹ETLMEYLENPKKYIPGK⁷⁹	2299,1526	2299,1426	Hidroxilação Tyr ⁷⁴
	2299,1526	2299,1426	Oxidação Tyr ⁷⁴
M⁸⁰IFAGIK⁸⁶	811,4382	811,4453	Dioxidação Met ⁸⁰
	843,428	843,4786	Dioxidação Met ⁸⁰ ; Dioxidação Phe ⁸²
	795,4433	795,4434	Oxidação Met ⁸⁰
M⁸⁰IFAGIKK⁸⁷	939,5331	939,5357	Dioxidação Met ⁸⁰
	939,5331	939,5286	Oxidação Phe ⁸² , Oxidação Met ⁸⁰
	923,5382	923,536	Oxidação Met ⁸⁰
M⁸⁰IFAGIKKKTEREDLIAYLKKATNE¹⁰⁴	2926,6069	2926,6443	Hidroxilação Leu ⁹⁸
T⁸⁹EREDLIAYLKK¹⁰⁰	1494,8163	1494,7906	Hidroxilação Tyr ⁹⁷
	1494,8163	1494,7906	Oxidação Tyr ⁹⁷

A título de exemplo são apresentados 3 espectros de MS/MS representativos obtidos após a análise com o *software DeNovo Explorer* versão 3.6 (Applied Biosystems) (Figura 20). O espectro A representa a oxidação da lisina 27 a ácido α -aminoadípico, onde podemos observar um desvio de 15Da. No espectro B encontra-se representado a oxidação da metionina 65, caracterizada por um desvio de 16Da. Finalmente, o espectro C apresenta a hidroxilação da tirosina 74, caracterizada por um desvio de 16Da.

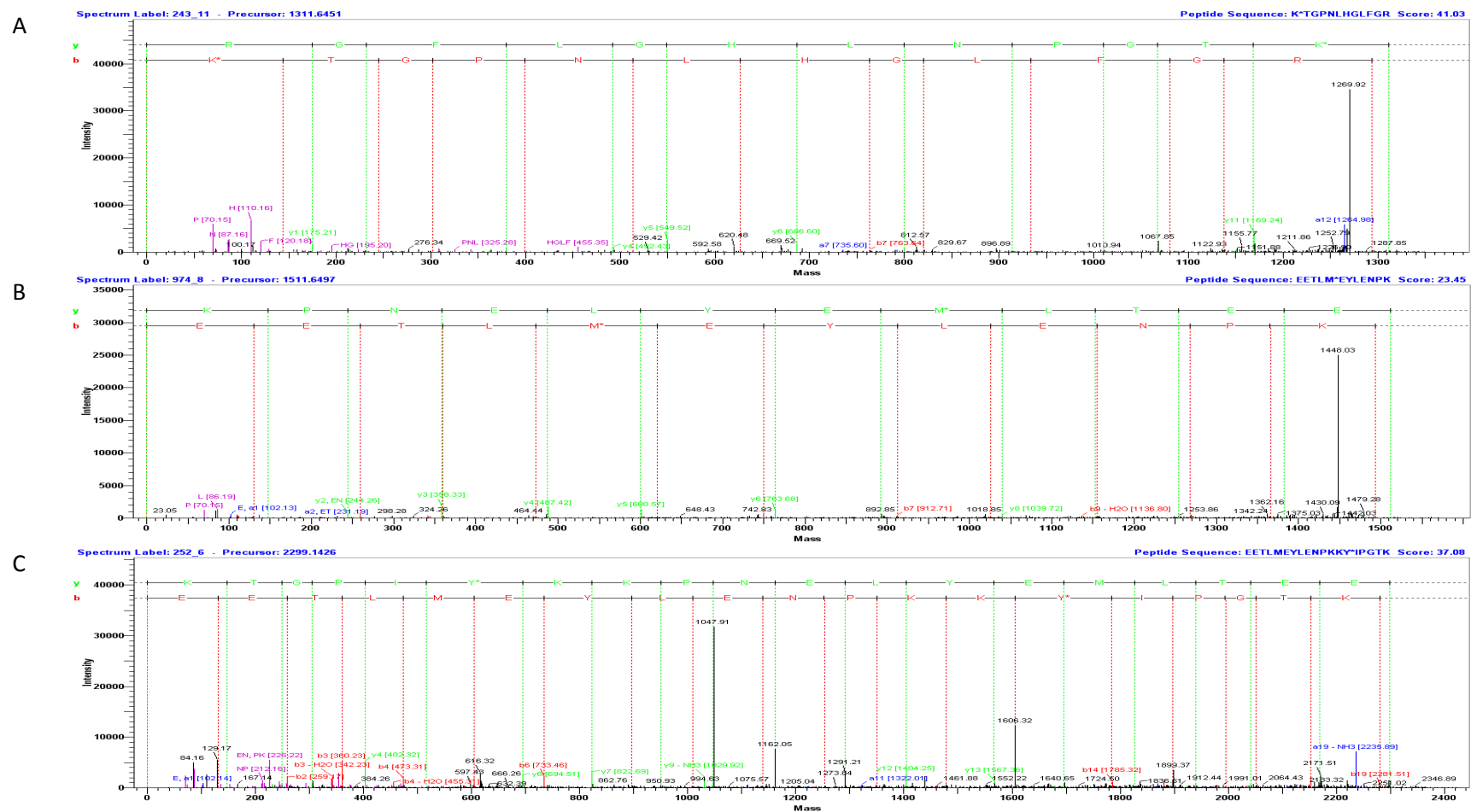


Figura 20: Espectros de MS/MS representativos após a análise com o software DeNovo Explorer. **A-** A fragmentação do íon com $m/z=1311,6451$ revelou o péptido KTGPNLHGLFGR, onde o resíduo K apresenta um desvio de 14,9632Da, correspondente à oxidação da lisina 27 a ácido α -aminoadípico. **B-** A fragmentação do íon com $m/z=1511,6497$ revelou o péptido EETLMEYLENPK, onde o resíduo M apresenta um desvio de 15,9949Da, correspondente à oxidação 65. **C-** A fragmentação do íon com $m/z=2299,1426$ revelou o péptido EETLMEYLENPKK*YIPGTK, onde o resíduo Y apresenta um desvio de 15,9949Da, correspondente à hidroxilação da tirosina 74. A vermelho encontram-se representados os picos de massa correspondentes aos íões b e a verde os picos de massa correspondentes aos íões y.

Na tabela 8 encontram-se listadas resumidamente as modificações oxidativas encontradas no citocromo c de coração de cavalo, onde podemos observar que as dioxidação, oxidação, hidroxilação foram as modificações mais frequentemente identificadas.

Tabela 8: Lista das modificações oxidativas identificadas no citocromo c de coração de cavalo.

Resíduo	Dioxidação	Hidroxilação	Oxidação	Pro-> Piro-Glu	Pro-> Pirrolidona	Trp-> Oxolactona	Lys-> ácido aminoadípico	Formil-quinurenina
Asn ³¹			√					
Asp ⁵⁰			√					
His ²⁶			√					
His ³³		√	√					
Leu ³²		√						
Leu ⁶⁴		√						
Leu ⁹⁸		√						
Lys ³⁹							√	
Lys ²⁷			√				√	
Lys ⁵⁵ Asn ⁵⁴			√					
Lys ⁶⁰			√					
Met ⁶⁵	√		√					
Met ⁸⁰	√		√					
Met ⁸⁰ e Phe ⁸²	√		√					
Pro ³⁰		√			√			
Pro ⁴⁴		√		√				
Pro ⁴⁴ e Phe ⁴⁶	√							
Trp ⁵⁹	√		√			√		√
Tyr ⁴⁸		√	√					
Tyr ⁶⁷		√	√					
Tyr ⁷⁴		√	√					
Tyr ⁹⁷		√	√					

Assim, resumidamente na figura 21 é apresentada a localização das modificações oxidativas identificadas na estrutura primária do citocromo c cardíaco de cavalo, indicando-se a verde os resíduos modificados.

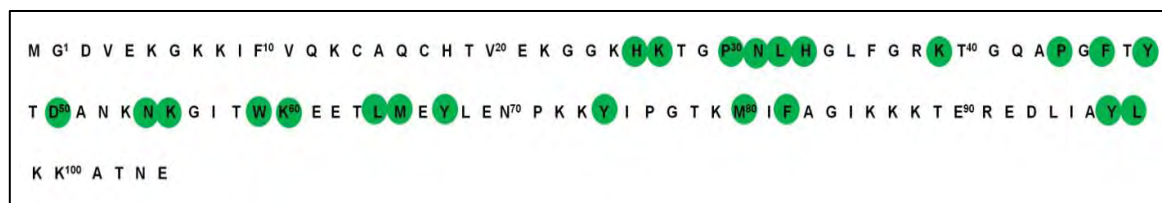


Figura 21: PTMs identificadas e sua localização na estrutura primária do citocromo c de coração de cavalo.

A oxidação do citocromo c pelo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ resultou na modificação de 10 resíduos de aminoácidos diferentes, incluindo ácido aspártico, asparagina, fenilalanina, leucina, lisina, metionina, prolina, tirosina e triptofano. De acordo com o número de resíduos de aminoácidos presentes na sequência de aminoácidos do citocromo c de coração de cavalo podemos observar que a susceptibilidade à oxidação não ocorre de forma aleatória, havendo alguns resíduos de aminoácidos mais susceptíveis à oxidação, conforme a figura 22.

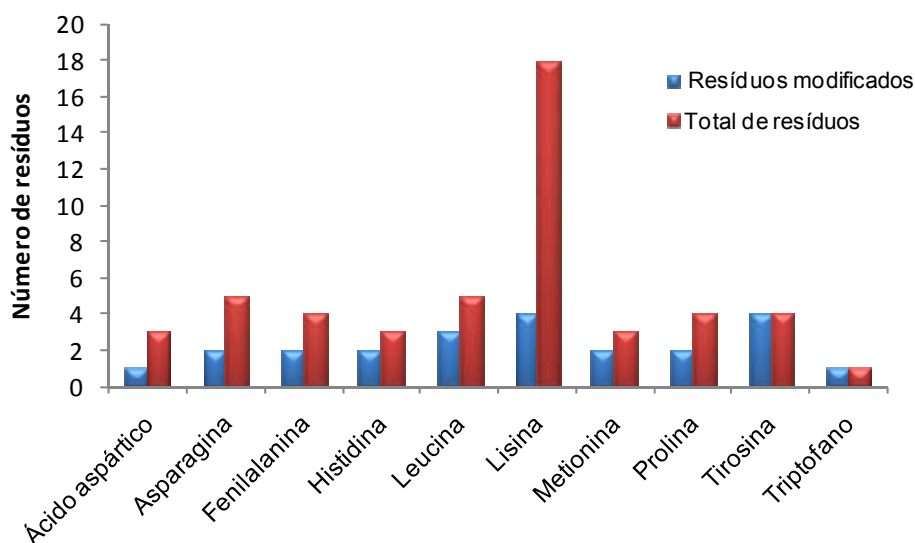


Figura 22: Relação entre o número total de cada resíduo de aminoácidos (vermelho) e o número de resíduos modificados (azul).

Tendo por base a relação número de resíduos modificados vs número total de cada resíduo de aminoácido, observamos que tirosina (100%), triptofano (100%), histidina (75%), metionina (75%) e leucina (60%) são, aparentemente, os resíduos de aminoácidos mais susceptíveis à oxidação.

1.2 Estudo *in vivo* das PTMs do citocromo c de coração de ratinho

As proteínas do homogeneizado total e da fracção mitocondrial do coração de ratinho dos diferentes grupos experimentais foram separadas por SDS-PAGE. Para a identificação e caracterização das PTMs do citocromo c por LC-MALDI-TOF/TOF excisaram-se as bandas do gel correspondentes ao peso molecular do citocromo c (aproximadamente 12kDa) dos diferentes grupos experimentais (Figura 23).

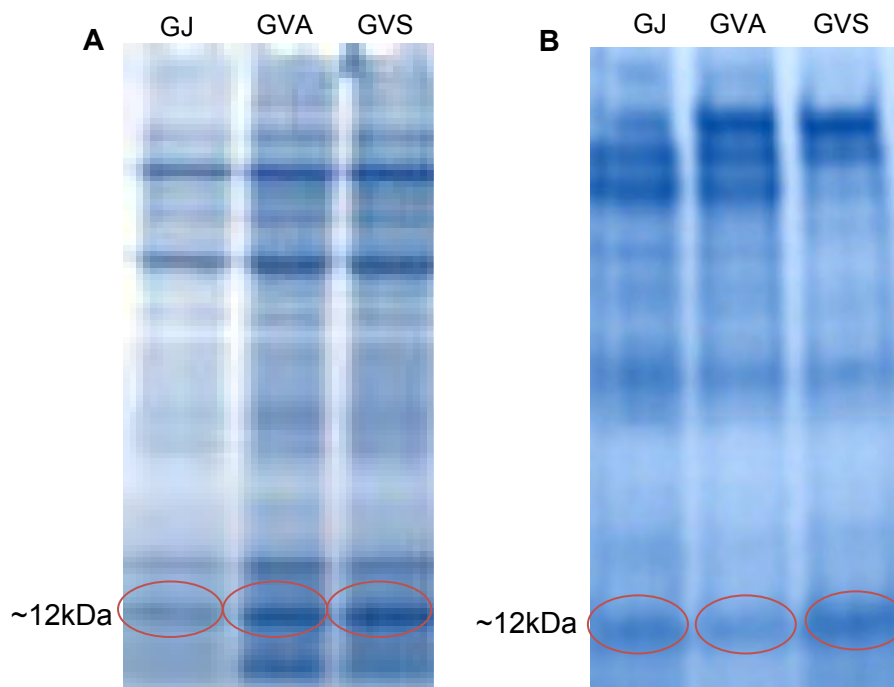


Figura 23: **A** - Imagem representativa de SDS-PAGE do homogeneizado total dos grupos experimentais. **B** - Imagem representativa de SDS-PAGE da fracção mitocondrial dos grupos experimentais.

No entanto, a abordagem experimental escolhida para a caracterização das PTMs do citocromo c *in vivo*, isto é, utilizando a espectrometria de massa após a separação das proteínas por SDS-PAGE, tem sido alvo de alguma controvérsia. Tem sido sugerido que algumas PTMs identificadas em tais condições experimentais poderão ser artefactos da técnica decorrentes, por exemplo, do manuseamento da amostra, nomeadamente durante a electroforese. Com a finalidade de validar a metodologia utilizada para este estudo, efectuou-se a separação do citocromo c comercial de coração de cavalo por SDS-PAGE seguida de digestão *in-gel* com tripsina e finalmente analisaram-se os péptidos trípticos por LC-MS/MS. Paralelamente, procedeu-se à digestão de citocromo c de coração de cavalo em solução com o objectivo de ser usado como procedimento de controlo. Os nossos resultados demonstraram que apenas a metionina 80 se encontra oxidada tanto no citocromo c separado por SDS-PAGE como no citocromo c em solução.

Deste modo, verificamos que a oxidação da metionina não é considerada um artefacto da electroforese nas condições experimentais empregues. Adicionalmente, estes resultados sugerem que a abordagem metodológica escolhida é adequada para a caracterização das PTMs do citocromo c, um dos objectivos do presente trabalho.

No sentido de identificar e caracterizar as PTMs do citocromo c cardíaco de ratinho dos grupos experimentais (GJ, GVA, GVS) procedeu-se à pesquisa no *Global Protein Server Workstation* (Applied Biosystems) das PTMs listadas na tabela 2 para a fracção mitocondrial e homogeneizado total.

Relativamente ao homogeneizado total observou-se que o padrão de péptidos modificados é dependente da idade e do estilo de vida (Tabela 9). O grupo dos animais jovens apresentou maior número de péptidos modificado oxidativamente (8 péptidos) em relação aos animais velhos activos (5 péptidos) e velhos sedentários (4 péptidos). No sentido de identificar com precisão quais as PTMs presentes no citocromo c de ratinho no homogeneizado total e qual o resíduo de aminoácido modificado, pesquisou-se no *GPS workstation* as PTMs apresentadas na tabela 2. Detectaram-se os iões com valores de m/z correspondentes às modificações oxidativas que foram posteriormente confirmadas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS). Foram analisados 300 espectros de MS/MS, resultando na confirmação total de 12 PTMs, que afectam 11 resíduos de aminoácidos. Na tabela 9, é apresentada a lista todos os péptidos modificados, bem como o tipo de modificação e localização dos resíduos modificados na estrutura primária.

Tabela 9: Lista das modificações pós-traducionais do citocromo c no homogeneizado total e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados correspondem aos modificados; ✓ significa presença da modificação)

Sequência de péptidos	Massa calculada	Massa teórica	Modificação	GJ	GVA	GVS
T²⁸<u>GPNLHGLFGR</u>³⁸	1184,617	1184,598	Hidroxilação Pro ³⁰	✓	✓	
	1184,617	1184,612	Oxidação His ³³	✓	✓	
	1184,617	1184,612	Oxidação Asn ³¹	✓	✓	
	1184,617	1184,587	Hidroxilação Lys ³²	✓	✓	
<u>K</u>²⁷TGPNLHGLFGR³⁸	1311,645	1311,641	Lys ²⁷ -> ácido aminoadípico	✓		
G⁵⁶<u>ITWGEDTLMEYLENPK</u>⁷²	2097,000	2097,006	Oxidação Met ⁶⁵	✓	✓	✓
	2097,000	2097,006	Oxidação do Trp ⁵⁹	✓		
G⁵⁶<u>ITWGEDTLMEYLENPKK</u>⁷³	2225,115	2225,1	Oxidação Met ⁶⁵	✓	✓	✓
	2225,116	2225,046	Oxidação Trp ⁵⁹	✓	✓	✓
	2225,116	2225,111	Hidroxilação Leu ⁶⁴	✓	✓	✓
G⁶¹<u>ETLMEYLENPK</u>⁷²	1511,640	1511,733	Oxidação Met ⁶⁵	✓		
	1511,650	1511,733	Hidroxilação Leu ⁶⁴	✓		
G⁶¹<u>ETLMEYLENPKKYIPG</u>TK⁷⁹	2299,153	2299,143	Oxidação Tyr ⁷⁴	✓	✓	✓
	2299,153	2299,143	Hidroxilação Tyr ⁷⁴	✓	✓	✓
<u>M</u>⁸⁰IFAGIK⁸⁶	795,443	795,453	Oxidação Met ⁸⁰	✓	✓	✓
<u>M</u>⁸⁰<u>IFAGIKK</u>⁸⁷	923,509	923,438	Oxidação Met ⁸⁰	✓		
	939,529	939,412	Oxidação Met ⁸⁰ , Oxidação Phe ⁸²	✓		

Na tabela 10 encontram-se listadas resumidamente as modificações oxidativas encontradas no citocromo c de ratinho no homogeneizado de coração, onde podemos observar que oxidação e a hidroxilação foram as modificações mais frequentemente identificadas. De uma forma geral verificou-se que os ratinhos jovens possuem maior número de PTMs do que os ratinhos velhos. Entre os animais velhos observou-se que o número PTMs também é diferente, pelo que os animais velhos activos têm maior número de modificações.

Tabela 10: Modificações pós-traducionais identificadas no citocromo c no homogeneizado total para os grupos experimentais (✓ significa presença da modificação).

PTMs	GJ	GVA	GVS
Hidroxilação Leu ⁶⁴	✓	✓	✓
Hidroxilação Lys ³²	✓	✓	
Hidroxilação Pro ³⁰	✓	✓	
Hidroxilação Tyr ⁷⁴	✓	✓	✓
Lys ²⁷ → ácido aminoadípico	✓		
Oxidação Asn ³¹	✓	✓	
Oxidação His ³³	✓	✓	
Oxidação Met ⁶⁵	✓	✓	✓
Oxidação Met ⁸⁰	✓	✓	✓
Oxidação Met ⁸⁰ ; Oxidação Phe ⁸²	✓		
Oxidação Trp ⁵⁹	✓	✓	✓
Oxidação Tyr ⁷⁴	✓	✓	✓

Na figura 24 é apresentado, resumidamente, o tipo (a cores diferentes) e a localização das modificações oxidativas totais identificadas na estrutura primária do citocromo c.

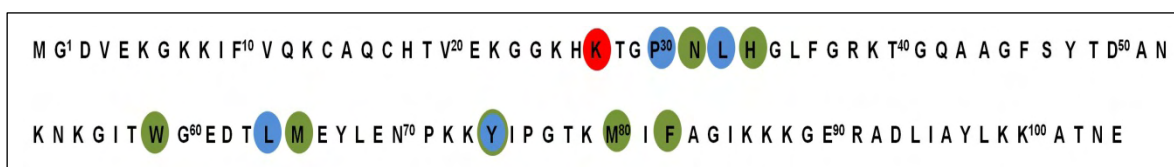


Figura 24: PTMs identificadas e sua localização na estrutura primária do citocromo c de coração de rato no homogeneizado total.

(● Hidroxilação; ● Oxidação; ● Hidroxilação e Oxidação; ● Lys → ácido aminoadípico).

À semelhança do efectuado para o homogeneizado total, na fracção mitocondrial também se procedeu à detecção dos iões com valores de m/z correspondentes às modificações oxidativas e posterior confirmação por MS/MS para os grupos experimentais (GJ, GVA, GVS). Apenas para os animais velhos sedentários se identificou um péptido modificado (GITWGETLM⁶⁵EYLENPK), tendo resultado na confirmação da oxidação da metionina 65 por MS/MS, conforme o espectro apresentado na figura 25.

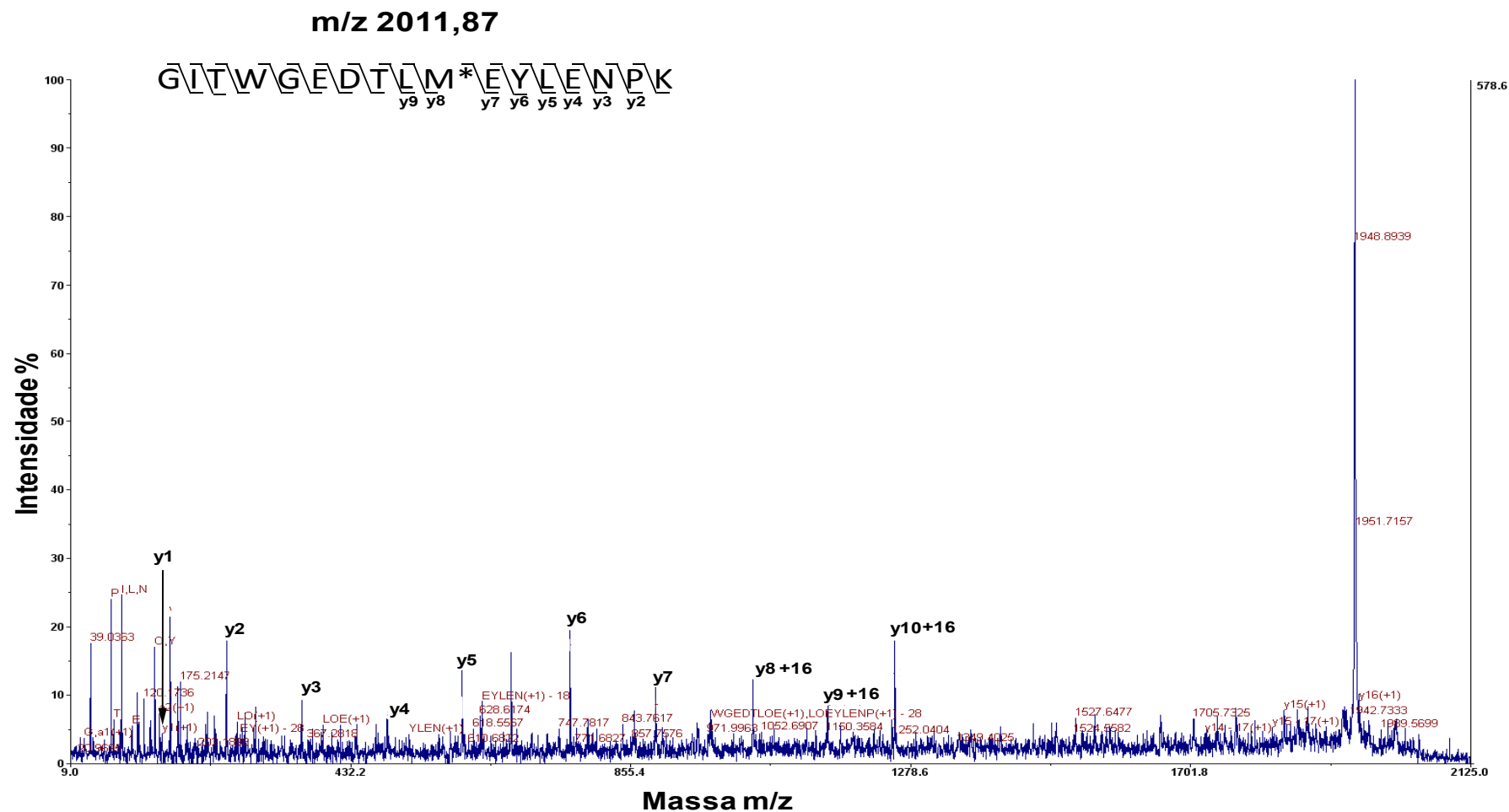


Figura 25: Espectro de MS/MS do péptido modificado oxidativamente GITWGETLMEYLENPK, com a m/z=2011,87, onde o resíduo M apresenta um desvio de +16Da, correspondente à oxidação da metionina 65.

De uma maneira geral, identificaram-se mais PTMs no citocromo c presente no homogeneizado total de músculo cardíaco (12 modificações) do que na fracção mitocondrial (1 modificação). A análise comparativa entre os grupos experimentais sugere que, no homogeneizado total de músculo cardíaco, o citocromo c dos animais jovens é mais susceptível à oxidação. Na fracção mitocondrial só se identificou uma modificação no citocromo c pertencente aos animais velhos sedentários.

IV. Discussão

A - Estudo da influência do estilo de vida na plasticidade do músculo cardíaco

1. Efeito do estilo de vida na adaptação mitocondrial cardíaca

Dos efeitos mais evidentes e bem estudados relacionados com o envelhecimento muscular, tanto esquelético como cardíaco, são a perda de massa muscular e a hipertrofia significativa (Juhaszova, Rabuel et al. 2005; Rosa, Silva et al. 2005). A hipertrofia cardíaca pode ser definida como um mecanismo de crescimento caracterizado pelo aumento da massa e volume celular, que deve ser diferenciado de hiperplasia e de aumento do número de células (Eisele, Schaefer et al. 2008), e tem sido considerado um mecanismo mais eficiente de compensação do coração frente à hiperfunção do miocárdio. A hipertrofia cardíaca depende do aumento de volume dos cardiomiócitos que ocorre paralelamente ao aumento da fibrose do miocárdio, provocando um aumento da massa e do volume generalizado do coração (Eisele, Schaefer et al. 2008). O rácio massa do coração/massa corporal permite avaliar o efeito do estilo de vida na adaptação mitocondrial cardíaca, sendo o aumento deste rácio sugestivo de hipertrofia cardíaca. No nosso estudo, verificamos que o rácio massa coração/massa corporal aumenta com o envelhecimento, tanto nos ratinhos activos como nos sedentários, sendo sugestivo de hipertrofia cardíaca (Tabela 3). Este resultado corrobora observações de outros estudos realizados, tanto em humanos como em roedores, onde se constatou que a adaptação cardíaca associada ao envelhecimento é caracterizada por um aumento da massa/volume do coração (Baldwin, Cooke et al. 1977; Tibbits, Koziol et al. 1978; Hickson, Galassi et al. 1983; Kingwell, Arnold et al. 1998; Zhan, Swallow et al. 1999; Allen, Harrison et al. 2001; Rosa, Silva et al. 2005). A hipertrofia cardíaca é normalmente considerada um marcador do envelhecimento, no entanto, deve ser interpretado com cautela porque está também associado à prática de exercício físico (Baldwin, Cooke et al. 1977; Tibbits, Koziol et al. 1978; Hickson, Galassi et al. 1983; Kingwell, Arnold et al. 1998; Allen, Harrison et al. 2001; Rosa, Silva et al. 2005). De acordo com o conceito de que os cardiomiócitos são células pós-mitóticas, o exercício induz um crescimento do miocárdio por mecanismos de hipertrofia, para compensar as necessidades energéticas do coração (Eisele, Schaefer et al. 2008). O exercício físico aumenta o consumo de energia pelo organismo, o que exige do coração um aumento da capacidade funcional e estrutural para satisfazer as necessidades desse aumento de consumo. Dependendo do tipo, duração e carga envolvida, o exercício pode alterar a estrutura cardíaca, podendo estas

alterações ser adaptativas ou nefastas (Eisele, Schaefer et al. 2008). Nos últimos anos, tem sido evidenciado que o exercício voluntário, onde os animais têm livre acesso a uma roda de actividade, constitui uma alternativa ao exercício extenuante e agudo, porque parece produzir menos stress para os animais na medida em que eles praticam exercício quando querem, sem manipulação nem administração de choques eléctricos (Allen, Harrison et al. 2001). No nosso estudo, verificamos que os ratinhos velhos activos que efectuaram exercício voluntário na roda de actividade desde a idade jovem apresentam maior massa cardíaca e menos massa corporal quando comparada com os ratinhos velhos sedentários (Tabela 3), como observado em vários estudos (Zhan, Swallow et al. 1999; Allen, Harrison et al. 2001). No entanto, Eisele *et al.* (2008) quando avaliaram as adaptações estruturais dos cardiomiócitos de ratinhos ao exercício voluntário verificaram que após 4 semanas, o exercício não induziu alterações na massa do coração ou na massa do ventrículo esquerdo quando comparado com os ratinhos sedentários, não tendo verificado diferenças no rácio massa do coração/massa corporal. Estes resultados contrastam com os do presente estudo e podem ser explicados pelos diferentes tempos de adaptação à resposta do exercício voluntário. Allen *et al.* (2001) determinaram o tempo de adaptação cardíaca ao exercício voluntário na roda do exercício, durante 1, 2 e 4 semanas e verificaram que a hipertrofia do músculo cardíaco torna-se evidente logo após a primeira semana de exercício, embora só tenha alcançado significância após 4 semanas de exercício.

A diminuição da massa corporal nos ratinhos sedentários activos pode ser sugestiva de uma diminuição do conteúdo de gordura, sendo considerado um factor protector para algumas doenças cardiovasculares e metabólicas. Assim, a hipertrofia cardíaca resultante do exercício parece estar relacionada com a melhoria da funcionalidade cardíaca (Machida, Tsujimoto et al. 2002; Eisele, Schaefer et al. 2008) e desta forma o exercício físico poderá atenuar de alguma forma os efeitos nefastos do envelhecimento cardíaco (Eisele, Schaefer et al. 2008).

Vários estudos realizados com roedores sugerem que o número de cópias de mtDNA diminui no músculo-esquelético e no fígado com a idade (Barazzoni, Short et al. 2000; Menshikova, Ritov et al. 2006). No entanto, a magnitude das diferenças do teor de mtDNA relaciona-se essencialmente com a capacidade oxidativa dos tecidos. Tem sido demonstrado que a diminuição do número de cópias de mtDNA de ratos jovens para ratos velhos é maior no músculo *soleus* do que no *gastrocnemius*, sendo o primeiro um músculo com maior capacidade oxidativa. Várias evidências sugerem que a biogénese mitocondrial depende dos requisitos energéticos de um tecido ou de um organismo sendo por isso estimulada pelo exercício aeróbio (Barazzoni, Short et al. 2000; Marin-Garcia and

Goldenthal 2002; Frahm, Mohamed et al. 2005). Apesar de o músculo cardíaco ser um tecido com elevada capacidade oxidativa, no nosso estudo não verificamos diferenças significativas no teor de mtDNA entre os ratinhos jovens e velhos (activos ou sedentários) (Tabela 4), à semelhança do observado por Nair (2005) e Frahm *et al.* (2005). Uma possível explicação para este facto é que o músculo cardíaco está em constante actividade contráctil. Esta actividade contráctil pode estimular a replicação e biogénese do mtDNA através da via mediada pela proteína cinase dependente da calmodulina/cálcio (CaMK) (Nair 2005). Curiosamente, parece não existir uma correlação entre o teor de mtDNA e a quantidade de polipéptidos mitocondriais ou de RNA mitocondrial pelo que o número de cópias de mtDNA não parece ser um factor limitante da funcionalidade mitocondrial (Barazzoni, Short et al. 2000; Frahm, Mohamed et al. 2005). Para avaliar o efeito do envelhecimento e do estilo de vida na biogénese mitocondrial outros parâmetros deveriam ser analisados nomeadamente a expressão do factor de transcrição mitocondrial A (Tfam) e os factores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF 1 e 2). Segundo Frahm *et al.* (2005) a manutenção da função mitocondrial é controlada a um nível transcripcional e não pelo número de cópias de mtDNA.

A mitocôndria dos cardiomiócitos contém 1-10 cópias de mtDNA (Marin-Garcia and Goldenthal 2002) que são constantemente renovadas, independentemente do ciclo celular, juntamente com a mitocôndria (Meissner 2007). Assumindo que o número de cópias de mtDNA/mitocôndria se mantém constante, o teor de mtDNA normalizado à massa de tecido poderá dar uma indicação, embora grosseira, do número de mitocôndrias no tecido. Assim sendo, os resultados sugerem um aumento tendencial do número de mitocôndrias com o envelhecimento, apesar de esta diferença não ser estatisticamente significativa. Apesar do aumento tendencial do número de mitocôndrias com o avanço da idade, muitas destas poderão encontrar-se disfuncionais (Trifunovic and Larsson 2008). Efectivamente, várias alterações morfológicas relacionadas com a idade têm sido descritas, incluindo a vacuolização da matriz, a perda parcial das cristas, o aumento do organelo e a diminuição da sua densidade. Contrariamente ao observado no nosso estudo, outros estudos têm demonstrado uma diminuição do conteúdo mitocondrial relacionado com a idade, tendo sido descrito o aparecimento de mitocôndrias gigantes (Terman and Brunk 2004; Figueiredo, Mota et al. 2008).

No entanto, a prática de exercício físico moderado parece contrariar esta tendência, aumentando o conteúdo mitocondrial. Eisele *et al.* (2008) verificaram um aumento significativo do número e do volume de mitocôndrias em ratinhos exercitados em comparação com os ratinhos inactivos. Menshikova *et al.* (2006) avaliaram o efeito do exercício físico em mitocôndrias de músculo-esquelético de indivíduos velhos e

verificaram que o número de cópias de mtDNA aumenta em resposta ao programa de exercício físico, reflectindo um aumento do conteúdo mitocondrial. No presente estudo não verificámos diferenças significativas do rácio mtDNA/massa de coração sugestivas de volumes mitocondriais distintos entre os ratinhos velhos activos e os ratinhos velhos sedentários (Tabela 4), o que poderá ser justificado pelo facto de o músculo cardíaco estar em constante actividade contráctil.

Mais ainda, verificámos que os níveis de proteína mitocondrial aumentaram significativamente com o envelhecimento (Tabela 4), embora quando normalizados à massa de tecido, as diferenças observadas entre os grupos experimentais não apresentaram significado estatístico. Estes resultados não estão de acordo com observações prévias de outros autores (Phaneuf and Leeuwenburgh 2002; Short, Bigelow et al. 2005) que sugerem uma diminuição da síntese de proteínas mitocondriais associada ao envelhecimento, tanto em humanos como em roedores. No entanto, o aumento do teor proteico observado poderá reflectir um aumento do teor de fragmentos e não propriamente de proteínas funcionais. Efectivamente, tem sido descrito um aumento da fragmentação com o envelhecimento consequente do aumento da lesão oxidativa (Grune, Shringarpure et al. 2001; Stadtman 2006). Por outro lado, associado ao envelhecimento também tem sido descrita uma diminuição do turnover proteico devido a defeitos das vias proteolíticas (Grune, Shringarpure et al. 2001; Stadtman and Levine 2003; Chakravarti and Chakravarti 2007; Lombardi, Silvestri et al. 2009). O metabolismo proteico pode ser fortemente afectado pelo exercício físico, tendo-se demonstrado, para o músculo-esquelético, um aumento do teor de proteína com o exercício físico (Short, Bigelow et al. 2005). No músculo cardíaco, Allen *et al.* (2001) descreveram um aumento da expressão de mRNAs induzida pelo exercício voluntário.

No nosso estudo avaliamos ainda o rácio quantidade de proteína/mtDNA (Tabela 4), ou seja, o teor proteico por mitocôndria como indicador grosseiro da densidade mitocondrial. Os resultados obtidos não evidenciam alterações deste parâmetro embora se tenha observado um ligeiro aumento nos velhos activos.

2. Alterações da actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial associadas ao envelhecimento e ao estilo de vida

A cadeia respiratória mitocondrial é o principal local de produção de RONS e, por isso, a mitocôndria acumula danos oxidativos mais rapidamente do que o resto da célula, contribuindo para a disfunção mitocondrial associada a doenças degenerativas e ao envelhecimento (Lenaz 1998). Tem sido descrito que com o envelhecimento aumentam os danos oxidativos nos complexos da cadeia respiratória de ratinho o que,

consequentemente, tem um impacto negativo na funcionalidade mitocondrial (Navarro and Boveris 2004; Navarro, Gomez et al. 2005; Choksi and Papaconstantinou 2008). Existe grande controvérsia sobre as alterações induzidas pelo envelhecimento nos vários complexos da cadeia respiratória. Como verificámos pela análise da figura 10 ocorreu uma diminuição significativa da actividade dos complexos II e V nos ratinhos velhos em relação aos ratinhos jovens. Inesperadamente a actividade do complexo I não apresentou diferenças significativas de actividade entre os grupos experimentais (Figura 10). No entanto, quando se efectuou a normalização da actividade ao teor de mtDNA, observamos uma diminuição significativa nos ratinhos velhos sedentários (Figura 11). Efectivamente, estudos anteriores têm demonstrado que o exercício físico moderado pode inverter esta tendência pela prevenção da redução da actividade dos complexos da cadeia respiratória (Navarro, Gomez et al. 2005). O complexo I, considerado um dos principais locais de produção de O_2^- (Kirkinezos and Moraes 2001; St-Pierre, Buckingham et al. 2002; Chen, Vazquez et al. 2003; Jezek and Hlavata 2005; Benard and Rossignol 2008; Figueiredo, Mota et al. 2008; Foster, Van Eyk et al. 2009; Murphy 2009; Sharma, Lu et al. 2009; Stowe 2009) e tem sido descrito como o complexo da cadeia respiratória mais comprometido com o envelhecimento (Lenaz, Bovina et al. 1997; Kumaran, Subathra et al. 2004), embora alguns estudos não tenham verificado alterações significativas associadas à idade (Kwong and Sohal 2000; Lesnefsky and Hoppel 2006). Kwong *et al.* (2000) constataram que a actividade do complexo I permanece inalterada no músculo-esquelético, coração e fígado de ratinhos durante o envelhecimento. No entanto, estudos realizados em cérebro verificaram que a actividade deste complexo diminui com o envelhecimento (Cocco et al., 2005). Esta diminuição significativa da actividade desta enzima em ratos velhos pode resultar na inibição do fluxo de electrões do NADH para oxigénio (Kumaran, Subathra et al. 2004) e potenciar a produção de ROS (Kwong and Sohal 2000).

Kumaran *et al.* (2004) demonstraram que a actividade do complexo II e III diminui nas mitocôndrias de coração e músculo-esquelético de ratos velhos, quando comparados com ratos jovens, mas esta diminuição parece ser menor do que a observada para os complexos I e IV. Os nossos resultados suportam estas observações dado que observamos uma diminuição significativa da actividade do complexo II com o envelhecimento, quer os resultados sejam normalizados à quantidade de proteína mitocondrial quer ao teor de mtDNA (Figuras 10 e 11). A diminuição da actividade deste complexo associada ao envelhecimento pode ser vista como um efeito secundário da diminuição dos níveis de moléculas enzimáticas activas por mitocôndria, ou devido à acumulação de moléculas alteradas no organelo (Drouet, Lauthier et al. 1999). No

entanto, tem sido sugerido que a actividade do complexo II permanece inalterada com o envelhecimento porque todas as subunidades deste complexo são codificadas pelo DNA, sendo este mais resistente ao stress oxidativo do que o mtDNA (Kumaran, Subathra et al. 2004).

A citocromo c oxidase é o complexo enzimático terminal da cadeia transportadora de electrões (complexo IV) e catalisa a transferência de electrões do citocromo c reduzido para o oxigénio molecular. Esta enzima é um componente vital para a transdução de energia celular para todo o oxigénio consumido pelos mamíferos (Barrientos 2002; Diaz, Fukui et al. 2006; Hosler, Ferguson-Miller et al. 2006; Navarro and Boveris 2007; Dudkina, Sunderhaus et al. 2008; Fontanesi, Soto et al. 2008). Kumaran *et al.* (2004) observaram uma diminuição da actividade deste complexo nos animais velhos, tendo verificado que este declínio na actividade pode causar um aumento da produção de H_2O_2 . Tem sido especulado que a diminuição da actividade da citocromo c oxidase resulta no bloqueamento parcial do fluxo de electrões, que actuam reduzindo os potenciais de alguns transportadores de electrões favorecendo a sua auto-oxidação e geração de $O_2^{\cdot-}$ (Kumaran, Subathra et al. 2004). Contrariamente a estes autores, Choksi *et al.* (2008) observaram uma tendência oposta, isto é, um aumento relacionado com a idade da actividade da citocromo c oxidase, embora estatisticamente não significativo, quando analisaram mitocôndrias isoladas de coração de ratinho. No nosso estudo a actividade deste complexo permaneceu inalterada embora quando normalizada ao teor de mtDNA se tenha observado um decréscimo significativo da actividade da citocromo c oxidase relacionado com o envelhecimento (Figura 10 e 11).

Tem sido sugerido que a prática de actividade física regular tem como potenciais benefícios a biogénese mitocondrial, a síntese de novos componentes da cadeia respiratória para aumentar a produção de energia, a redução da lesão oxidativa e o aumento da capacidade antioxidante (Judge, Jang et al. 2005; Boveris and Navarro 2008). Os resultados de funcionalidade mitocondrial obtidos no presente estudo sugerem que a actividade física ao longo da vida reverte significativamente a diminuição da actividade da ATP sintetase por mitocôndria associada ao envelhecimento (Figura 11). Uma vez que a actividade contráctil no coração é constante, os efeitos benéficos da actividade física regular na funcionalidade mitocondrial não são tão evidentes como em outros tecidos, constituindo o músculo-esquelético um bom exemplo (Figueiredo, Powers et al. 2009).

3.Efeito do envelhecimento e do estilo de vida na susceptibilidade das proteínas à carbonilação e nitração

Como já foi referido anteriormente, a cadeia respiratória mitocondrial é o principal local de produção de RONS e, por isso, a mitocôndria acumula danos oxidativos mais rapidamente do que o resto da célula (Lenaz 1998). De entre as várias biomoléculas, as proteínas constituem alvos preferências dos RONS. A lesão oxidativa das proteínas pode afectar de forma significativa as suas características bioquímicas (Prokai, Yan et al. 2007). Porque as proteínas têm funções biológicas diferentes e únicas, as modificações oxidativas podem comprometer a funcionalidade da célula (Shacter 2000; Chakravarti and Chakravarti 2007). A par do aumento da lesão oxidativa, a própria acumulação de proteínas oxidadas em determinadas condições fisiopatológicas pode ser também o reflexo de danos aleatórios no DNA de um ou mais genes que codificam proteínas que regulam a produção de ROS, ou dos sistemas antioxidantes, e da actividade proteolítica (Chao, Ma et al. 1997; Requena, Levine et al. 2003).

Dos vários métodos que têm sido descritos para avaliar a oxidação proteica, a carbonilação das proteínas tem sido utilizada preferencialmente como marcador de lesão de proteínas (Shacter 2000; Chakravarti and Chakravarti 2007; Prokai, Yan et al. 2007). Com o intuito de compreender quais as bases bioquímicas subjacentes à perda de funcionalidade cardíaca associada ao envelhecimento, no presente estudo avaliamos não só o teor de grupos carbonilo como também as potenciais proteínas alvo da lesão oxidativa. Os nossos resultados corroboram evidências anteriores (Beal 2002; Levine 2002; Shringarpure and Davies 2002; Stadtman 2002; Requena, Levine et al. 2003; Chakravarti and Chakravarti 2007; Chung, Miranda et al. 2008; Murray, Oquendo et al. 2008) de que o envelhecimento está associado a um aumento significativo do teor de grupos carbonilos (Figuras 14 e 15), ou seja de lesão oxidativa, embora não pareça existir consenso na literatura sobre este assunto (Yan, Levine et al. 2000). Curiosamente, os nossos resultados sugerem que a prática de exercício físico regular aumenta a lesão oxidativa das proteínas cardíacas, ao contrário do verificado no músculo-esquelético (Figueiredo, Powers et al. 2009). Inclusivamente, tem sido descrito que a actividade dos sistemas antioxidantes, como por exemplo da MnSOD, no coração de ratinho aumenta com a prática de exercício físico (Navarro, Gomez et al. 2004).

Quando analisamos o músculo cardíaco no total ou a fracção mitocondrial em particular verificámos existirem não apenas diferenças quantitativas entre os diferentes grupos experimentais como também qualitativas (Figuras 14B e 15B). Efectivamente, no perfil de carbonilação das proteínas mitocondriais são evidentes bandas marcadas com

anti-DNP na zona de baixo peso molecular (banda 7 e 8) nos ratinhos velhos que não aparecem nos jovens (Figura 15B). No sentido de averiguar quais as proteínas que são preferencialmente afectadas de forma dependente do estilo de vida, identificamos por LC-MS/MS as proteínas presentes nas bandas marcadas com anti-DNP (Tabela 5). Como potenciais proteínas alvo da carbonilação independente da idade e do estilo de vida, identificamos algumas subunidades dos complexos da cadeia respiratória, nomeadamente as subunidades alfa e beta da ATP sintetase e a subunidade 1 do citocromo bc1 (Tabela 5). A maior susceptibilidade dos complexos da cadeia respiratória à lesão oxidativa tem sido referida por vários autores (Meany, Xie et al. 2007; Prokai, Yan et al. 2007; Choksi and Papaconstantinou 2008). O complexo III é um dos principais locais de produção de ROS pelo que não constitui surpresa que a subunidade 1 ou Core 1 deste complexo (banda 3, Figura 14), que se encontra na proximidade do local previsto de produção de ROS (Choksi and Papaconstantinou 2008), seja um alvo de modificação oxidativa. Atendendo à sua localização e abundância, o complexo V também se apresenta como um forte candidato a lesão oxidativa. À semelhança do constatado no presente trabalho, estudos anteriores identificaram as subunidades alfa e beta da ATP sintetase como carboniladas em mitocôndrias de diferentes tecidos animais (Meany, Xie et al. 2007; Prokai, Yan et al. 2007; Choksi and Papaconstantinou 2008; Feng, Xie et al. 2008). A isocitrato desidrogenase mitocondrial (banda 7; Figura 15) foi outra das proteínas identificadas nos três grupos experimentais como potencial alvo à carbonilação. Também Feng *et al.* (2008) encontraram esta proteína carbonilada em mitocôndrias isoladas de músculo-esquelético de rato mas, ao contrário do constatado neste estudo, dependente da idade. A elevada susceptibilidade das enzimas do ciclo de Krebs a modificações oxidativas e as concomitantes repercussões funcionais que daí advêm têm sido referidas por vários autores (Prokai, Yan et al. 2007; Feng, Xie et al. 2008). Apesar destas proteínas alvo terem sido identificadas em todos os grupos experimentais, o teor relativo da carbonilação destas proteínas parece ser dependente da idade, sendo maior no grupo GVA (Figuras 14B e 15B) à semelhança do observado no homogeneizado total para o teor total de grupos carbonilo (Figura 14A).

Como proteínas alvo da carbonilação dependente da idade identificamos a creatina quinase sarcomérica e a proteína de transporte *Ras-related protein Rab 21*. A oxidação da creatina quinase, uma enzima fulcral na transdução de energia em tecidos com elevadas exigências energéticas como o coração, foi previamente identificada no músculo-esquelético de ratos velhos (Feng, Xie et al. 2008) e em ratinhos Apo-E *knockout*, um modelo animal da doença de Alzheimer (Choi, Forster et al. 2004) A albumina sérica foi outra das proteínas identificadas como alvo potencial da carbonilação,

tendo-se também observado fragmentos desta proteína reactivos ao anticorpo anti-DNP (Tabela 5). A elevada susceptibilidade da albumina sérica à oxidação e consequente fragmentação não constitui surpresa atendendo à sua conhecida acção antioxidante (Roche, Rondeau et al. 2008). No entanto, a identificação desta proteína na fracção mitocondrial poderá ser atribuída a questões metodológicas. Nos animais velhos activos também se identificaram fragmentos de duas isoformas de miosina como potencialmente carbonilados. A carbonilação das proteínas das miofibrilas pode comprometer a capacidade de produção de força à semelhança do constatado por Yamada *et al.* (2007) quando analisaram o diafragma de ratos com hipertiroidismo.

Outras das modificações pós-traducionais extremamente relevantes do ponto de vista funcional são as nitrosilações e nitrações, embora menos estudadas do que as carbonilações. O óxido nítrico (NO^{*}) tem sido bastante estudado pelo seu papel como mediador fisiológico, ao nível do tónus vascular, da neurotransmissão e da resposta imune (Giuffre, Barone et al. 2000; Valko, Rhodes et al. 2006) e no coração o NO^{*} parece ter um papel central na regulação da contracção cardíaca, consumo de oxigénio, apoptose e hipertrofia (Davidson and Duchon 2006). Menos atenção tem sido dada à capacidade do NO^{*} em interagir com uma variedade de outras moléculas tais como o anião superóxido, a glutatona e a macromoléculas (DNA e proteínas) modificando-as (Martinez-Ruiz and Lamas 2004). O NO^{*} pode modificar as proteínas de diferentes formas. As proteínas podem reagir directamente com o NO^{*} ou com as espécies reactivas de azoto formadas como resultado da interacção entre o NO^{*} com outros radicais e oxigénio. A reacção entre o NO^{*} e o anião superóxido resulta na formação do anião peroxinitrito que é extremamente reactivo modificando biomoléculas como as proteínas (Abello, Kerstjens et al. 2009). Os resíduos de tirosina constituem um dos principais alvos do peroxinitrito com consequente formação de 3-nitrotirosina (Alvarez and Radi 2003; Radi 2004; Abello, Kerstjens et al. 2009) pelo que a avaliação do teor de 3-nitrotirosina constitui um bom indicador da lesão de proteínas por RNS. Apesar da maioria das proteínas conter resíduos de tirosina (abundância natural: 3.2%), nem a abundância relativa de uma proteína nem a abundância de resíduos de tirosina numa dada proteína ajudam a prever se essa proteína constitui um alvo preferencial da nitração, contrariamente ao que inicialmente se poderia supor (Abello, Kerstjens et al. 2009). Estudos anteriores têm demonstrado que a nitração não é um processo aleatório (Radi 2004; Abello, Kerstjens et al. 2009). Assim, no sentido de avaliar se o processo de envelhecimento está associado a um aumento do teor de nitração e se existem proteínas alvo preferenciais, pesquisou-se por western-blotting a presença de 3-nitrotirosina quer no extracto de coração quer na fracção mitocondrial. Numa perspectiva geral, os

resultados obtidos sugerem que o teor de 3-nitrotirosina aumenta com o envelhecimento (Figura 16A e 17A), como sugerido por estudos anteriores (van der Loo, Labugger et al. 2000; Kanski, Alterman et al. 2003; Kanski, Behring et al. 2005). Efectivamente, a análise do homogeneizado de músculo cardíaco evidenciou não apenas um aumento da quantidade de 3-nitrotirosina associado ao envelhecimento como também um acréscimo do número de bandas marcadas com o anticorpo específico para este tipo de modificação (Figura 17B). Efectivamente, nos ratinhos jovens observaram-se duas bandas marcadas (bandas 1 e 4) e nos animais velhos detectou-se 6 bandas correspondentes a proteínas nitradas. Apesar de a mitocôndria ser um local primordial de produção de RNS, na fracção mitocondrial observaram-se menos bandas marcadas pelo anticorpo anti-3-nitrotirosina e as diferenças entre os grupos experimentais foram apenas quantitativas (Figura 17B). Ao contrário do observado para o miocárdio na totalidade, a prática de exercício físico ao longo da vida conferiu protecção das proteínas mitocondriais à nitração (Figura 17).

No sentido de avaliar quais as potenciais proteínas alvo à nitração, por LC-MS/MS identificámos as proteínas presentes nas bandas marcadas com o anticorpo para a 3-nitrotirosina (Tabela 6). Muitas das proteínas identificadas como susceptíveis à carbonilação (Tabela 5) também se afiguram como potenciais alvo da nitração, nomeadamente as subunidades alfa e beta da ATP sintetase, a subunidade 1 do complexo III, a creatina quinase e a albumina sérica. Estas proteínas alvo da nitração foram identificadas nos três grupos experimentais analisados. As proteínas cardíacas encontram-se expostas a fluxos periódicos de NO[•] que controlam a função cardíaca (Xu, Huso et al. 1999; Kanski, Behring et al. 2005). Assim, a ocorrência de nitração dos resíduos de tirosina nas proteínas dos animais jovens não constitui surpresa. No entanto, os resultados obtidos no nosso estudo sugerem que a acumulação de proteínas nitradas ocorre a uma taxa maior nos animais velhos comparativamente aos jovens, como previamente reportado por Kanski *et al.* (2005). Apesar das proteínas nitradas serem alvo de degradação proteossomal (Conconi and Friguet 1997), a actividade deste sistema proteolítico diminui com a idade (Conconi and Friguet 1997) o que potencia a acumulação destas proteínas nitradas na célula.

A maioria das proteínas identificadas como potencialmente nitradas está envolvida na produção de energia do miocárdio e o aumento do teor de nitração com a idade pode estar associada com o declínio da função mitocondrial cardíaca associado ao envelhecimento (Figuras 10 e 11). Choksi e Papaconstantinou (2008) também encontraram nitradas algumas subunidades dos complexos da cadeia respiratória, nomeadamente a flavoproteína 2 do complexo I, a subunidade 2 da citocromo c oxidase,

a subunidade beta da ATP sintetase e o core 1 do complexo III, embora não tenham observado uma correlação com a actividade destes complexos. No entanto, num outro estudo do mesmo grupo (Choksi, Nuss et al. 2007) foi observada uma relação directa entre a ocorrência de modificações associadas à idade e a perda de funcionalidade dos complexos da ETC de mitocôndrias de rim de ratinho. A nitração da creatina quinase (banda 3, Figura 16B) foi já descrita por Kanski *et al.*, (2005) quando analisaram o músculo-esquelético de ratos com 34 meses de idade. Inclusivamente, estes autores identificaram a Tyr¹⁴ e a Tyr²⁰ como os resíduos mais susceptíveis à nitração. Estes mesmos autores também identificaram resíduos de 3-nitrotirosina em enzimas do metabolismo de ácidos gordos (Kanski, Hong et al. 2005). Além das proteínas metabólicas, no nosso estudo também identificámos uma proteína estrutural, a actina, como proteína alvo da nitração (banda 5 da figura 16B, tabela 6). A actina é uma das proteínas mais abundantes nas células eucarióticas. Como se verifica para as restantes proteínas do citosqueleto, a actina contém uma elevada percentagem de resíduos de tirosina, muitos dos quais são cruciais na interacção proteína-proteína. Enquanto que pequenas proporções de subunidades modificadas poderão estabilizar os filamentos da fragmentação favorecendo a polimerização, uma taxa elevada de nitração poderá levar a uma perda do controlo da dinâmica da actina (Aslan, Ryan et al. 2003).

A análise integrada dos resultados sugere que o aumento da susceptibilidade de proteínas específicas do músculo cardíaco à carbonilação e nitração parece explicar, pelo menos em parte, a disfunção cardíaca associada ao processo natural de envelhecimento. Contrariamente ao inicialmente esperado tendo por base os dados da actividade dos complexos da cadeia respiratória, não se obtiveram evidências claras do efeito nefasto de um estilo de vida sedentário na susceptibilidade das proteínas do músculo cardíaco à carbonilação e/ou nitração.

B - Estudo das PTMs do citocromo c cardíaco

1. Identificação e caracterização das PTMs do citocromo c cardíaco

Sendo, a mitocôndria o principal local de produção de RONS, o citocromo c é um importante alvo de lesão oxidativa. As PTMs podem levar à inactivação do citocromo c e consequentemente afectar a actividade da cadeia respiratória e a apoptose, bem como parece desempenhar um importante papel no processo de envelhecimento (Kim, Rodriguez et al. 2008). As RONS têm sido associadas a diferentes estágios de apoptose. Neste sentido, tem sido proposto que o citocromo c libertado da mitocôndria pode representar uma proteína modificada quimicamente pelo stress oxidativo (Hortelano, Alvarez et al. 1999), ou tem origem em microcompartimentos diferentes do citocromo c envolvido na cadeia respiratória (Oursler, Bradley et al. 2005). Uma vez que existem poucos estudos que avaliam a oxidação/nitração do citocromo c quer *in vitro* quer *in vivo*, torna-se necessária uma melhor compreensão das modificações que afectam o citocromo c para relacionar com a disfunção mitocondrial associada ao envelhecimento. Os avanços das técnicas de proteómica têm permitido a identificação de muitas modificações pós-traducionais em várias proteínas. No entanto, a caracterização de uma proteína por MS implica a análise de centenas de variantes de péptidos (Nielsen, Savitski et al. 2006).

Numa primeira abordagem, avaliou-se a expressão de citocromo c no homogeneizado total e na fracção mitocondrial para os três diferentes grupos experimentais (GJ, GVA, GVS). Phaneuf *et al.* (2002) estudaram a expressão do citocromo c na fracção mitocondrial e citoplasmática de coração de rato velhos e não observaram alterações significativas do teor desta proteína na fracção mitocondrial associadas à idade. No entanto, a expressão desta pequena proteína na fracção citoplasmática aumentou com a idade, sugerindo que o citocromo c é libertado para o citosol com o envelhecimento, participando na activação da cascata da apoptose. No nosso estudo, verificámos que a expressão do citocromo c de coração de ratinho tanto na fracção mitocondrial (Figura 12) como no homogeneizado total (Figura 13) aumenta com o envelhecimento, independentemente do estilo de vida. No sentido de averiguar se o aumento do teor de citocromo c associado ao envelhecimento reflecte a acumulação da proteína modificada oxidativamente, no presente estudo, caracterizamos as PTMs no citocromo c de coração de ratinho e relacionamos com as PTMs identificadas num estudo *in vitro* utilizando o citocromo c de coração de cavalo comercial.

Para o estudo *in vitro* das PTMs procedeu-se à oxidação do citocromo c de coração de cavalo comercial segundo a reacção de Fenton, em que a exposição ao H_2O_2 torna muitas proteínas susceptíveis a danos oxidativos (Kim, Jeong et al. 2006; Kim and Kang 2006). No nosso estudo verificámos que o citocromo c quando exposto ao $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ é modificado oxidativamente e são vários os resíduos de aminoácidos que podem ser alvo de danos oxidativos pelas espécies reactivas geradas. Encontrámos 35 péptidos oxidados (Tabela 7), tendo-se identificado os seguintes resíduos modificados: Asn³¹, Asn⁵⁴, Asp⁵⁰, His²⁶, His³³, Leu³², Leu⁶⁴, Leu⁹⁸, Lys³⁹, Lys²⁷, Lys⁵⁵, Lys⁶⁰, Met⁸⁰, Met⁶⁵, Phe⁸², Phe⁴⁶, Pro³⁰, Pro⁴⁴, Trp⁴⁹, Tyr⁴⁸, Tyr⁶⁷, Tyr⁷⁴, Tyr⁹⁷ (Tabela 8). Nukuna *et al.* (2004), utilizando a radiólise, observaram quatro péptidos modificados, tendo identificado como resíduos de aminoácidos susceptíveis à oxidação a Met⁸⁰, a Met⁶⁵, a Tyr⁷⁴, a Tyr⁹² (também detectados nas nossas condições experimentais) e Phe³⁶, a Phe¹⁰, a Phe⁴⁶, Phe⁸² (não detectados no nosso estudo). À semelhança do estudo de Nukuna *et al.* (2004) mas utilizando doses mais baixas de radiação, Thariat *et al.* (2008) apenas identificaram a oxidação da Met⁸⁵ e Phe³⁰. Efectivamente, a oxidação do citocromo c com $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ resultou na oxidação de 10 resíduos de aminoácidos diferentes, incluindo o ácido aspártico, a asparagina, a fenilalanina, a leucina, a lisina, a metionina, a prolina, a tirosina e o tritofano. De acordo com o número de resíduos de aminoácidos presentes na sequência de aminoácidos do citocromo c de coração de cavalo podemos sugerir que a susceptibilidade à oxidação não ocorre de forma aleatória, havendo alguns resíduos mais susceptíveis à oxidação (Figura 22), pelo que os resíduos mais próximo do grupo heme são os mais susceptíveis à oxidação. Para além disso, verificámos que os resíduos mais susceptíveis à oxidação são a tirosina, o triptofano, a histidina, a metionina e a leucina. À semelhança do observado no presente estudo, Kim *et al.* (2006) verificaram que os resíduos de tirosina, de histidina e de metionina são particularmente sensíveis à oxidação por H_2O_2 , apesar de não terem identificado na estrutura da proteína a localização dos resíduos modificados.

Porque a taxa de produção de H_2O_2 é elevada na mitocôndria (Nukuna, Sun et al. 2004) é de esperar que estas e outras RONS possam causar alguns danos oxidativos no citocromo c que possa resultar na alteração da sua funcionalidade. Tem sido sugerido que as modificações no citocromo c podem afectar a sua interacção com o citocromo c1 e com a subunidade II da citocromo c oxidase, afectando a cadeia respiratória mitocondrial (Smith, Ahmed et al. 1981). Outros estudos sugerem que a apoptose pode não ser apenas regulada pelos níveis de citocromo c libertado para o citosol mas também pelas modificações directas do citocromo c (Schonhoff, Gaston et al. 2003; Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008). Neste sentido avaliamos qual efeito do estilo de vida

no perfil de PTMs do citocromo c cardíaco, analisando tanto o homogeneizado do músculo cardíaco como a fracção mitocondrial.

Relativamente ao homogeneizado total observou-se que o padrão de péptidos do citocromo c modificados é dependente da idade e do estilo de vida. Verificou-se que os ratinhos jovens apresentam um maior número de péptidos modificados em relação aos ratinhos velhos (Tabela 9). Foram analisados 300 espectros de MS/MS, resultando na confirmação de um total de 12 PTMs, que afectam 11 resíduos de aminoácidos (Leu⁶⁴, Lys³², Lys²⁷, Pro³⁰, Trp⁵⁹, Tyr⁷⁴, Met⁸⁰, Met⁶⁵, His³³, Asn³¹, Phe⁸²), tendo estes resíduos de aminoácidos sido encontrados modificados no estudo *in vitro* (Tabela 7). O menor número de resíduos de aminoácidos encontrados modificados no citocromo c *in vivo*, comparativamente com o observado no estudo *in vitro*, poderá ser parcialmente justificado pela existência *in vivo* de sistemas proteolíticos que degradam as proteínas modificadas (Grune, Shringarpure et al. 2001; Stadtman and Levine 2003)

De entre as PTMs pesquisadas (Tabela 2), verificou-se que a oxidação e a hidroxilação são as PTMs mais comuns. Curiosamente, apesar da expressão de citocromo c aumentar com o envelhecimento (Figura 12), foi identificado um maior número de modificações oxidativas no citocromo c de ratinhos jovens (12 PTMs) do que no ratinhos velhos activos (10 PTMs) e ratinhos velhos sedentários (6 PTMs). A oxidação da Lys²⁷ a ácido aminoadípico (+15Da) e a oxidação da Phe⁸² (+16Da) foram apenas observadas nos ratinhos jovens, podendo conferir ganho de função quando relacionados com os resultados da actividade dos complexos da cadeia respiratória (Figuras 10 e 11). Comparando os grupos experimentais, observou-se que alguns dos resíduos modificados são comuns independentemente da idade, nomeadamente a Leu⁶⁴, Tyr⁷⁴, Met⁶⁵, Met⁸⁰ e o Trp⁵⁹. Entre os ratinhos velhos, verificou-se que os animais activos possuem um maior número de modificações, e apenas no grupo GVA foram encontrados os resíduos de Lys³², Pro³⁰, Asn³¹ e His³³ modificados. Num estudo realizado com leveduras (Dopner, Hildebrandt et al. 1999) foi sugerido que modificações nos resíduos de lisina próximos do grupo heme diminuem a interacção desta proteína com a citocromo c oxidase. No presente estudo não se identificou nenhuma modificação nesses resíduos de Lys (Lys⁷², Lys⁷³, Lys⁷⁹, Lys⁸⁶, Lys⁸⁷). A modificação dos resíduos de aminoácidos das posições 7, 25, 39 e 62-65 parece contribuir para a interacção entre o citocromo c e o Apaf-1 (Ow, Green et al. 2008). De entre estes, a Leu⁶⁴ e a Met⁶⁵ foram encontradas modificadas em todos os grupos experimentais pelo que não parece contribuir para a diminuição da funcionalidade cardíaca associada ao envelhecimento. A avaliação de outros parâmetros bioquímicos seria necessária para estabelecer uma relação entre a modificação destes resíduos de aminoácidos e a activação da apoptose.

Apesar de a susceptibilidade do citocromo c à nitração já ter sido observada *in vivo* (Hortelano, Alvarez et al. 1999; MacMillan-Crow, Cruthirds et al. 2001; Alonso, Encinas et al. 2002; Cruthirds, Novak et al. 2003; Ueta, Kamatani et al. 2003), no nosso estudo não identificámos o citocromo c como potencialmente nitrado utilizando o anticorpo anti-3-nitrotirosina (Figuras 16B e 17B). Adicionalmente, apesar de pesquisadas por MS/MS, não foram encontradas nitrações nos resíduos de tirosina do citocromo c cardíaco de ratinho. Este facto pode ser explicado pela existência de um sistema de desnitração na mitocôndria, como recentemente sugerido (Rodriguez-Roldan, Garcia-Heredia et al. 2008).

No que se refere à fracção mitocondrial identificou-se apenas uma modificação no citocromo c, a oxidação da Met⁶⁵ (Figura 25). Esta modificação foi identificada apenas nos ratinhos velhos sedentários, grupo experimental no qual se observou uma maior expressão de citocromo c. Curiosamente, a modificação deste resíduo de aminoácido foi identificada no citocromo c de todos os grupos experimentais quando se analisou o homogeneizado total do músculo cardíaco.

Algumas das PTMs identificadas em estudos *in vivo*, nomeadamente a oxidação da metionina, têm sido consideradas artefactos atribuídos ao processamento da amostra, nomeadamente durante a separação por electroforese (Sun and Anderson 2004; Froelich and Reid 2008). Nesse sentido, para averiguar este facto efectuamos a separação do citocromo c comercial de coração de cavalo por SDS-PAGE seguida de digestão in-gel com tripsina e posterior análise dos péptidos tripticos por LC-MS/MS. Paralelamente, efectuamos a digestão do citocromo c de cavalo em solução para comparação das modificações oxidativas encontradas. Em ambas as condições testadas apenas se identificou a oxidação da Met⁸⁰, o que sugere que a abordagem metodológica escolhida para a caracterização das PTMs do citocromo c *in vivo* é adequada.

VI. Conclusão

Com o intuito de avaliar a influência do estilo de vida na plasticidade mitocondrial e na susceptibilidade das proteínas do músculo cardíaco e do citocromo c em particular à oxidação/nitração, delineou-se um protocolo experimental envolvendo a análise de vários parâmetros bioquímicos no homogeneizado total e na fracção mitocondrial do coração de ratinhos jovens, velhos activos e velhos sedentários. Os resultados obtidos permitiram-nos tirar as seguintes conclusões:

- i. A actividade dos complexos II e V da cadeia respiratória diminui com o envelhecimento sendo, no entanto, dependente do estilo de vida.
- ii. O aumento da susceptibilidade de proteínas específicas do músculo cardíaco à carbonilação e/ou nitração parece explicar a disfunção cardíaca associada ao envelhecimento.
- iii. Como potenciais alvo da carbonilação e nitração independente da idade e do estilo de vida foram identificadas algumas subunidades dos complexos da cadeia respiratória, nomeadamente, as subunidades alfa e beta da ATP sintetase e a subunidade 1 do citocromo bc1. A flavoproteína 2 da NADH desidrogenase e a subunidade 2 da citocromo c oxidase também foram identificaram como potencialmente nitradas independentemente da idade.
- iv. As proteínas creatina quinase, *Ras-related protein Rab-21*, malato desidrogenase, flavoproteína 2 da NADH desidrogenase, subunidade 2 da citocromo c oxidase foram identificadas como potencialmente susceptíveis à carbonilação dependente da idade.
- v. O estilo de vida apenas parece influenciar a susceptibilidade das proteínas mitocondriais à nitração, tendo-se verificado que a prática de exercício físico ao longo da vida confere protecção contra a nitração de proteínas mitocondriais.
- vi. Dos 300 espectros de MS/MS analisados identificámos um total de 12 PTMs em 11 resíduos de aminoácidos diferentes do citocromo c do coração de ratinho, sendo as mais comuns a oxidação e a hidroxilação.
- vii. No citocromo c do homogeneizado total, identificou-se um maior número de PTMs nos ratinhos jovens do que nos ratinhos velhos e, de entre estes, os animais activos foram os que apresentaram um maior número de PTMs.
- viii. A modificação dos resíduos de aminoácidos Leu⁶⁴, Tyr⁷⁴, Met⁶⁵, Met⁸⁰ e Trp⁵⁹ parece ser independente da idade.

- ix. A oxidação da Met⁶⁵ foi a única PTM encontrada no citocromo c da fracção mitocondrial, tendo, apenas, sido identificada nos ratinhos velhos sedentários.

De um modo geral, podemos concluir que o envelhecimento é um importante factor condicionante da funcionalidade mitocondrial cardíaca, aparentemente justificado pelo aumento da susceptibilidade das proteínas do músculo cardíaco a modificações pós-traducionais. No entanto, o estilo de vida parece regular a plasticidade e a funcionalidade mitocondrial cardíaca.

VII – Referências Bibliográficas

VI. Referências Bibliográficas

- Abello, N., H. A. Kerstjens, et al. (2009). "Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins." J Proteome Res.
- Abriata, L. A., A. Cassina, et al. (2009). "Nitration of Solvent-exposed Tyrosine 74 on Cytochrome c Triggers Heme Iron-Methionine 80 Bond Disruption: NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE AND OPTICAL SPECTROSCOPY STUDIES." J Biol Chem **284**(1): 17-26.
- Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, et al. (2008). "Respiratory active mitochondrial supercomplexes." Mol Cell **32**(4): 529-39.
- Agarwal, S. and R. S. Sohal (1995). "Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging." Mech Ageing Dev **85**(1): 55-63.
- Allen, D. L., B. C. Harrison, et al. (2001). "Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse." J Appl Physiol **90**(5): 1900-8.
- Alonso, D., J. M. Encinas, et al. (2002). "Coexistence of translocated cytochrome c and nitrated protein in neurons of the rat cerebral cortex after oxygen and glucose deprivation." Neuroscience **111**(1): 47-56.
- Alvarez, B. and R. Radi (2003). "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins." Amino Acids **25**(3-4): 295-311.
- Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva, et al. (2005). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 200-14.
- Angelopoulou, R., G. Lavranos, et al. (2009). "ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology." Reprod Toxicol.
- Ascensao, A. A., J. F. Magalhaes, et al. (2005). "Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise." Int J Sports Med **26**(4): 258-67.
- Aslan, M., T. M. Ryan, et al. (2003). "Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization." J Biol Chem **278**(6): 4194-204.
- Babusikova, E., M. Jesenak, et al. (2008). "Oxidative alternations in rat heart homogenate and mitochondria during ageing." Gen Physiol Biophys **27**(2): 115-20.
- Bailey, S. M., A. Landar, et al. (2005). "Mitochondrial proteomics in free radical research." Free Radic Biol Med **38**(2): 175-88.
- Balasubramanian, D. and R. Kanwar (2002). "Molecular pathology of dityrosine cross-links in proteins: structural and functional analysis of four proteins." Mol Cell Biochem **234-235**(1-2): 27-38.
- Baldwin, K. M., D. A. Cooke, et al. (1977). "Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs." J Appl Physiol **42**(2): 267-72.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (1999). "Mitochondrial cytochromes c: a comparative analysis." J Biol Inorg Chem **4**(6): 824-37.
- Barazzoni, R., K. R. Short, et al. (2000). "Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart." J Biol Chem **275**(5): 3343-7.

- Barja, G. (1999). "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity." J Bioenerg Biomembr **31**(4): 347-66.
- Barrientos, A. (2002). "In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities." Methods **26**(4): 307-16.
- Batthyany, C., J. M. Souza, et al. (2005). "Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite." Biochemistry **44**(22): 8038-46.
- Baynes, J. W. (2001). "The role of AGEs in aging: causation or correlation." Exp Gerontol **36**(9): 1527-37.
- Beal, M. F. (2002). "Oxidatively modified proteins in aging and disease." Free Radic Biol Med **32**(9): 797-803.
- Benard, G. and R. Rossignol (2008). "Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics." Antioxid Redox Signal **10**(8): 1313-42.
- Bernhard, D. and G. Laufer (2008). "The aging cardiomyocyte: a mini-review." Gerontology **54**(1): 24-31.
- Bianchi, C., R. Fato, et al. (2003). "Structural and functional organization of Complex I in the mitochondrial respiratory chain." Biofactors **18**(1-4): 3-9.
- Birch-Machin, M. A., H. L. Briggs, et al. (1994). "An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria." Biochem Med Metab Biol **51**(1): 35-42.
- Boekema, E. J. and H. P. Braun (2007). "Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system." J Biol Chem **282**(1): 1-4.
- Boveris, A. and A. Navarro (2008). "Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents." Free Radic Biol Med **44**(2): 224-9.
- Brandt, U. (2006). "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)." Annu Rev Biochem **75**: 69-92.
- Brookes, P. S. (2005). "Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple." Free Radic Biol Med **38**(1): 12-23.
- Brookes, P. S., A. L. Levonen, et al. (2002). "Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species." Free Radic Biol Med **33**(6): 755-64.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, et al. (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-33.
- Brown, G. C. (2001). "Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase." Biochim Biophys Acta **1504**(1): 46-57.
- Brown, G. C. and V. Borutaite (2007). "Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart." Cardiovasc Res **75**(2): 283-90.
- Carreras, M. C., M. C. Franco, et al. (2004). "Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease." Mol Aspects Med **25**(1-2): 125-39.
- Carrilho, M. P., L (2009). "A situação demográfica em Portugal." Revista de estudos demográficos. **42**.
- Cassina, A. and R. Radi (1996). "Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport." Arch Biochem Biophys **328**(2): 309-16.

- Cassina, A. M., R. Hodara, et al. (2000). "Cytochrome c nitration by peroxynitrite." J Biol Chem **275**(28): 21409-15.
- Castro, L., J. P. Eiserich, et al. (2004). "Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration." Arch Biochem Biophys **421**(1): 99-107.
- Cecarini, V., J. Gee, et al. (2007). "Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism." Biochim Biophys Acta **1773**(2): 93-104.
- Cecchini, G. (2003). "Function and structure of complex II of the respiratory chain." Annu Rev Biochem **72**: 77-109.
- Chabi, B., V. Ljubicic, et al. (2008). "Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle." Aging Cell **7**(1): 2-12.
- Chakravarti, B. and D. N. Chakravarti (2007). "Oxidative modification of proteins: age-related changes." Gerontology **53**(3): 128-39.
- Chao, C. C., Y. S. Ma, et al. (1997). "Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2969-74.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, et al. (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." J Biol Chem **278**(38): 36027-31.
- Chen, Y. R., C. L. Chen, et al. (2004). "Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical." J Biol Chem **279**(17): 18054-62.
- Chen, Y. R., L. J. Deterding, et al. (2002). "Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity." J Biol Chem **277**(33): 29781-91.
- Choi, J., M. J. Forster, et al. (2004). "Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: relevance to Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **36**(9): 1155-62.
- Choksi, K. B., W. H. Boylston, et al. (2004). "Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes." Biochim Biophys Acta **1688**(2): 95-101.
- Choksi, K. B., J. E. Nuss, et al. (2007). "Age-related increases in oxidatively damaged proteins of mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes." Free Radic Biol Med **43**(10): 1423-38.
- Choksi, K. B. and J. Papaconstantinou (2008). "Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes." Free Radic Biol Med **44**(10): 1795-805.
- Chung, W. G., C. L. Miranda, et al. (2008). "Detection of carbonyl-modified proteins in interfibrillar rat mitochondria using N'-aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin as an aldehyde/keto-reactive probe in combination with Western blot analysis and tandem mass spectrometry." Electrophoresis **29**(6): 1317-24.
- Collins, T. J., M. J. Berridge, et al. (2002). "Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells." EMBO J **21**(7): 1616-27.
- Conconi, M. and B. Friguet (1997). "Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90." Mol Biol Rep **24**(1-2): 45-50.
- Cruthirds, D. L., L. Novak, et al. (2003). "Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion." Arch Biochem Biophys **412**(1): 27-33.

- Dalle-Donne, I., R. Rossi, et al. (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clin Chim Acta **329**(1-2): 23-38.
- Davidson, S. M. and M. R. Duchon (2006). "Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance." Cardiovasc Res **71**(1): 10-21.
- Diaz, F., H. Fukui, et al. (2006). "Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts." Mol Cell Biol **26**(13): 4872-81.
- DiMarco, T. and C. Giulivi (2007). "Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples." Mass Spectrom Rev **26**(1): 108-20.
- Dimmer, K. S. and L. Scorrano (2006). "(De)constructing mitochondria: what for?" Physiology (Bethesda) **21**: 233-41.
- Distler, A. M., J. Kerner, et al. (2007). "Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry." Biochim Biophys Acta **1774**(5): 628-36.
- Dopner, S., P. Hildebrandt, et al. (1999). "The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase." Eur J Biochem **261**(2): 379-91.
- Drouet, M., F. Lauthier, et al. (1999). "Age-associated changes in mitochondrial parameters on peripheral human lymphocytes." Exp Gerontol **34**(7): 843-52.
- Duchon, M. R. (2004). "Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology." Mol Aspects Med **25**(4): 365-451.
- Dudkina, N. V., J. Heinemeyer, et al. (2006). "Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane." Trends Plant Sci **11**(5): 232-40.
- Dudkina, N. V., S. Sunderhaus, et al. (2008). "The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes." J Bioenerg Biomembr **40**(5): 419-24.
- Dufour, E. and N. G. Larsson (2004). "Understanding aging: revealing order out of chaos." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 122-32.
- Eisele, J. C., I. M. Schaefer, et al. (2008). "Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle." Basic Res Cardiol **103**(1): 12-21.
- Elfering, S. L., V. L. Haynes, et al. (2004). "Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(1): H22-9.
- Feng, J., H. Xie, et al. (2008). "Quantitative proteomic profiling of muscle type-dependent and age-dependent protein carbonylation in rat skeletal muscle mitochondria." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **63**(11): 1137-52.
- Figueiredo, P. A., M. P. Mota, et al. (2008). "The role of mitochondria in aging of skeletal muscle." Biogerontology **9**(2): 67-84.
- Figueiredo, P. A., S. K. Powers, et al. (2009). "Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(1): 21-33.
- Fontanesi, F., I. C. Soto, et al. (2008). "Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation." IUBMB Life **60**(9): 557-68.

- Foster, D. B., J. E. Van Eyk, et al. (2009). "Redox signaling and protein phosphorylation in mitochondria: progress and prospects." J Bioenerg Biomembr.
- Frahm, T., S. A. Mohamed, et al. (2005). "Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart." Mech Ageing Dev **126**(11): 1192-200.
- Frazier, A. E., C. Kiu, et al. (2006). "Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells." Biol Chem **387**(12): 1551-8.
- Frey, T. G. and C. A. Mannella (2000). "The internal structure of mitochondria." Trends Biochem Sci **25**(7): 319-24.
- Friguet, B. (2006). "Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress." FEBS Lett **580**(12): 2910-6.
- Friguet, B., A. L. Bulteau, et al. (2008). "Mitochondrial protein quality control: implications in ageing." Biotechnol J **3**(6): 757-64.
- Froelich, J. M. and G. E. Reid (2008). "The origin and control of ex vivo oxidative peptide modifications prior to mass spectrometry analysis." Proteomics **8**(7): 1334-45.
- Garesse, R. and C. G. Vallejo (2001). "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes." Gene **263**(1-2): 1-16.
- Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." Cell Death Differ **13**(9): 1423-33.
- Genova, M. L., A. Baracca, et al. (2008). "Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity?" Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 740-6.
- Ghafourifar, P. and E. Cadenas (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase." Trends Pharmacol Sci **26**(4): 190-5.
- Ghafourifar, P., U. Schenk, et al. (1999). "Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation." J Biol Chem **274**(44): 31185-8.
- Giuffre, A., M. C. Barone, et al. (2000). "Reaction of nitric oxide with the turnover intermediates of cytochrome c oxidase: reaction pathway and functional effects." Biochemistry **39**(50): 15446-53.
- Giulivi, C. (2003). "Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase." Free Radic Biol Med **34**(4): 397-408.
- Giulivi, C., N. J. Traaseth, et al. (2003). "Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance." Amino Acids **25**(3-4): 227-32.
- Gow, A. J., C. R. Farkouh, et al. (2004). "Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(2): L262-8.
- Grivennikova, V. G. and A. D. Vinogradov (2006). "Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 553-61.
- Grune, T., R. Shringarpure, et al. (2001). "Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(11): B459-67.
- Gustafsson, A. B. and R. A. Gottlieb (2008). "Heart mitochondria: gates of life and death." Cardiovasc Res **77**(2): 334-43.
- Hamel, P., V. Corvest, et al. (2009). "Biochemical requirements for the maturation of mitochondrial c-type cytochromes." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 125-38.

- Harper, M. E., L. Bevilacqua, et al. (2004). "Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling." Acta Physiol Scand **182**(4): 321-31.
- Hickson, R. C., T. M. Galassi, et al. (1983). "Repeated development and regression of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats." J Appl Physiol **54**(3): 794-7.
- Hipkiss, A. R. (2006). "Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects." Exp Gerontol **41**(5): 464-73.
- Hoppel, C. L., S. Moghaddas, et al. (2002). "Interfibrillar cardiac mitochondrial complex III defects in the aging rat heart." Biogerontology **3**(1-2): 41-4.
- Hortelano, S., A. M. Alvarez, et al. (1999). "Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages." FASEB J **13**(15): 2311-7.
- Hosler, J. P., S. Ferguson-Miller, et al. (2006). "Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes." Annu Rev Biochem **75**: 165-87.
- Hoye, A. T., J. E. Davoren, et al. (2008). "Targeting mitochondria." Acc Chem Res **41**(1): 87-97.
- Huang, H. and K. G. Manton (2004). "The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review." Front Biosci **9**: 1100-17.
- Huang, J. H. and D. A. Hood (2009). "Age-associated mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: Contributing factors and suggestions for long-term interventions." IUBMB Life **61**(3): 201-14.
- Huttemann, M., I. Lee, et al. (2008). "Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease." J Bioenerg Biomembr **40**(5): 445-56.
- Ischiropoulos, H. (2003). "Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 776-83.
- Ischiropoulos, H. (2009). "Protein tyrosine nitration--an update." Arch Biochem Biophys **484**(2): 117-21.
- Isom, A. L., S. Barnes, et al. (2004). "Modification of Cytochrome c by 4-hydroxy- 2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts." J Am Soc Mass Spectrom **15**(8): 1136-47.
- Jackson, M. J., S. Papa, et al. (2002). "Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function." Mol Aspects Med **23**(1-3): 209-85.
- Jahangir, A., S. Sagar, et al. (2007). "Aging and cardioprotection." J Appl Physiol **103**(6): 2120-8.
- Jang, B. and S. Han (2006). "Biochemical properties of cytochrome c nitrated by peroxynitrite." Biochimie **88**(1): 53-8.
- Janssen, A. J., F. J. Trijbels, et al. (2007). "Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts." Clin Chem **53**(4): 729-34.
- Janssen, R. J., L. G. Nijtmans, et al. (2006). "Mitochondrial complex I: structure, function and pathology." J Inherit Metab Dis **29**(4): 499-515.
- Jezek, P. and L. Hlavata (2005). "Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism." Int J Biochem Cell Biol **37**(12): 2478-503.

- Johnson, D. T., R. A. Harris, et al. (2007). "Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C689-97.
- Joseph, A. M., A. A. Rungi, et al. (2004). "Compensatory responses of protein import and transcription factor expression in mitochondrial DNA defects." Am J Physiol Cell Physiol **286**(4): C867-75.
- Judge, S., Y. M. Jang, et al. (2005). "Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging." FASEB J **19**(3): 419-21.
- Judge, S., Y. M. Jang, et al. (2005). "Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**(6): R1564-72.
- Judge, S. and C. Leeuwenburgh (2007). "Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging." Am J Physiol Cell Physiol **292**(6): C1983-92.
- Juhaszova, M., C. Rabuel, et al. (2005). "Protection in the aged heart: preventing the heart-break of old age?" Cardiovasc Res **66**(2): 233-44.
- Jung, T., N. Bader, et al. (2007). "Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome." Arch Biochem Biophys **462**(2): 231-7.
- Kang, D., S. H. Kim, et al. (2007). "Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions." Mitochondrion **7**(1-2): 39-44.
- Kanski, J., M. A. Alterman, et al. (2003). "Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle." Free Radic Biol Med **35**(10): 1229-39.
- Kanski, J., A. Behring, et al. (2005). "Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(1): H371-81.
- Kanski, J., S. J. Hong, et al. (2005). "Proteomic analysis of protein nitration in aging skeletal muscle and identification of nitrotyrosine-containing sequences in vivo by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry." J Biol Chem **280**(25): 24261-6.
- Kim, J., M. E. Rodriguez, et al. (2008). "Oxidative modification of cytochrome c by singlet oxygen." Free Radic Biol Med **44**(9): 1700-11.
- Kim, N. H., M. S. Jeong, et al. (2006). "Oxidative modification of cytochrome c by hydrogen peroxide." Mol Cells **22**(2): 220-7.
- Kim, N. H. and J. H. Kang (2006). "Oxidative damage of DNA induced by the cytochrome C and hydrogen peroxide system." J Biochem Mol Biol **39**(4): 452-6.
- Kingwell, B. A., P. J. Arnold, et al. (1998). "The effects of voluntary running on cardiac mass and aortic compliance in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **16**(2): 181-5.
- Kirkinezos, I. G. and C. T. Moraes (2001). "Reactive oxygen species and mitochondrial diseases." Semin Cell Dev Biol **12**(6): 449-57.
- Kluck, R. M., L. M. Ellerby, et al. (2000). "Determinants of cytochrome c pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation." J Biol Chem **275**(21): 16127-33.
- Kluck, R. M., S. J. Martin, et al. (1997). "Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system." EMBO J **16**(15): 4639-49.

- Knowles, M. K., M. G. Guenza, et al. (2002). "Cytoskeletal-assisted dynamics of the mitochondrial reticulum in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14772-7.
- Koopman, W. J., H. J. Visch, et al. (2005). "Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency." Am J Physiol Cell Physiol **289**(4): C881-90.
- Korlimbinis, A. and R. J. Truscott (2006). "Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. A possible role in age-related nuclear cataract." Biochemistry **45**(6): 1950-60.
- Koves, T. R., R. C. Noland, et al. (2005). "Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism." Am J Physiol Cell Physiol **288**(5): C1074-82.
- Kumaran, S., M. Subathra, et al. (2004). "Age-associated decreased activities of mitochondrial electron transport chain complexes in heart and skeletal muscle: role of L-carnitine." Chem Biol Interact **148**(1-2): 11-8.
- Kushnareva, Y., A. N. Murphy, et al. (2002). "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state." Biochem J **368**(Pt 2): 545-53.
- Kwong, L. K. and R. S. Sohal (2000). "Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse." Arch Biochem Biophys **373**(1): 16-22.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lakatta, E. G. (2002). "Cardiovascular ageing in health sets the stage for cardiovascular disease." Heart Lung Circ **11**(2): 76-91.
- Lakatta, E. G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging." Circulation **107**(3): 490-7.
- Larson, S. K., D. Dwyer, et al. (2006). "Mitochondrial cytochrome c reacts with nitric oxide via S-nitrosation." Biochem Biophys Res Commun **342**(3): 991-5.
- Lee, I., A. R. Salomon, et al. (2006). "New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo." Biochemistry **45**(30): 9121-8.
- Leeuwenburgh, C., P. Hansen, et al. (1998). "Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): R453-61.
- Leeuwenburgh, C. and J. W. Heinecke (2001). "Oxidative stress and antioxidants in exercise." Curr Med Chem **8**(7): 829-38.
- Lenaz, G. (1998). "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 53-67.
- Lenaz, G., C. Bovina, et al. (1997). "Mitochondrial complex I defects in aging." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 329-33.
- Lesnefsky, E. J., T. I. Gudiz, et al. (2001). "Aging decreases electron transport complex III activity in heart interfibrillar mitochondria by alteration of the cytochrome c binding site." J Mol Cell Cardiol **33**(1): 37-47.
- Lesnefsky, E. J. and C. L. Hoppel (2006). "Oxidative phosphorylation and aging." Ageing Res Rev **5**(4): 402-33.

- Levine, R. L. (2002). "Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease." Free Radic Biol Med **32**(9): 790-6.
- Li, Y., M. D'Aurelio, et al. (2007). "An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria." J Biol Chem **282**(24): 17557-62.
- Liu, Y., G. Fiskum, et al. (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." J Neurochem **80**(5): 780-7.
- Logan, D. C. (2006). "The mitochondrial compartment." J Exp Bot **57**(6): 1225-43.
- Lombardi, A., E. Silvestri, et al. (2009). "Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach." J Proteomics **72**(4): 708-21.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Machida, S., H. Tsujimoto, et al. (2002). "Age-related differences in the effect of running training on cardiac Myosin isozyme composition in rats." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **57**(9): B339-43.
- MacMillan-Crow, L. A., D. L. Cruthirds, et al. (2001). "Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy." Free Radic Biol Med **31**(12): 1603-8.
- Maechler, P. (2002). "Mitochondria as the conductor of metabolic signals for insulin exocytosis in pancreatic beta-cells." Cell Mol Life Sci **59**(11): 1803-18.
- Marin-Garcia, J. and M. J. Goldenthal (2002). "[The mitochondrial organelle and the heart]." Rev Esp Cardiol **55**(12): 1293-310.
- Marin-Garcia, J. and M. J. Goldenthal (2002). "Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review." J Card Fail **8**(5): 347-61.
- Martinez-Ruiz, A. and S. Lamas (2004). "S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction." Cardiovasc Res **62**(1): 43-52.
- Meany, D. L., H. Xie, et al. (2007). "Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry." Proteomics **7**(7): 1150-63.
- Meissner, C. (2007). "Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process?" Z Gerontol Geriatr **40**(5): 325-33.
- Menshikova, E. V., V. B. Ritov, et al. (2006). "Effects of exercise on mitochondrial content and function in aging human skeletal muscle." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **61**(6): 534-40.
- Ministério da Saúde, D.-G. d. S. (2004). "Plano Nacional de Saúde 2004-2010: mais saúde para todos." **II- Orientações estratégicas**: 216.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J **417**(1): 1-13.
- Murray, J., C. E. Oquendo, et al. (2008). "Monitoring oxidative and nitrative modification of cellular proteins; a paradigm for identifying key disease related markers of oxidative stress." Adv Drug Deliv Rev **60**(13-14): 1497-503.
- Nair, K. S. (2005). "Aging muscle." Am J Clin Nutr **81**(5): 953-63.
- Nakagawa, D., Y. Ohshima, et al. (2001). "Functional modification of cytochrome c by peroxynitrite in an electron transfer reaction." Chem Pharm Bull (Tokyo) **49**(12): 1547-54.

- Nakagawa, H., N. Komai, et al. (2007). "Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome C is associated with caspase-cascade inactivation." Biol Pharm Bull **30**(1): 15-20.
- Navarro, A. and A. Boveris (2004). "Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(5): R1244-9.
- Navarro, A. and A. Boveris (2007). "The mitochondrial energy transduction system and the aging process." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C670-86.
- Navarro, A., C. Gomez, et al. (2004). "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R505-11.
- Navarro, A., C. Gomez, et al. (2005). "Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**(5): R1392-9.
- Nielsen, M. L., M. M. Savitski, et al. (2006). "Extent of modifications in human proteome samples and their effect on dynamic range of analysis in shotgun proteomics." Mol Cell Proteomics **5**(12): 2384-91.
- Niess, A. M. and P. Simon (2007). "Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species." Front Biosci **12**: 4826-38.
- Nisoli, E. and M. O. Carruba (2006). "Nitric oxide and mitochondrial biogenesis." J Cell Sci **119**(Pt 14): 2855-62.
- Nukuna, B. N., G. Sun, et al. (2004). "Hydroxyl radical oxidation of cytochrome c by aerobic radiolysis." Free Radic Biol Med **37**(8): 1203-13.
- Olivetti, G., M. Melissari, et al. (1991). "Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy." Circ Res **68**(6): 1560-8.
- Ott, M., V. Gogvadze, et al. (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." Apoptosis **12**(5): 913-22.
- Oursler, M. J., E. W. Bradley, et al. (2005). "Native, not nitrated, cytochrome c and mitochondria-derived hydrogen peroxide drive osteoclast apoptosis." Am J Physiol Cell Physiol **288**(1): C156-68.
- Ow, Y. P., D. R. Green, et al. (2008). "Cytochrome c: functions beyond respiration." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(7): 532-42.
- Pamplona, R., E. Dalfo, et al. (2005). "Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets." J Biol Chem **280**(22): 21522-30.
- Patriarca, A., T. Eliseo, et al. (2009). "ATP acts as a regulatory effector in modulating structural transitions of cytochrome c: implications for apoptotic activity." Biochemistry **48**(15): 3279-87.
- Perla-Kajan, J., L. Marcjak, et al. (2007). "Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome C." Biochemistry **46**(21): 6225-31.
- Petrosillo, G., M. Matera, et al. (2009). "Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin." Free Radic Biol Med **46**(1): 88-94.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, et al. (2003). "Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin." FASEB J **17**(6): 714-6.

- Phaneuf, S. and C. Leeuwenburgh (2002). "Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**(2): R423-30.
- Pietraforte, D., A. M. Salzano, et al. (2003). "Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine." Amino Acids **25**(3-4): 341-50.
- Powers, S. K., J. Quindry, et al. (2004). "Aging, exercise, and cardioprotection." Ann N Y Acad Sci **1019**: 462-70.
- Poyton, R. O. and J. E. McEwen (1996). "Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes." Annu Rev Biochem **65**: 563-607.
- Prokai, L., L. J. Yan, et al. (2007). "Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria." J Mass Spectrom **42**(12): 1583-9.
- Ptolemy, A. S., R. Lee, et al. (2007). "Strategies for comprehensive analysis of amino acid biomarkers of oxidative stress." Amino Acids **33**(1): 3-18.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-8.
- Radi, R., A. Cassina, et al. (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." Free Radic Biol Med **33**(11): 1451-64.
- Requena, J. R., R. L. Levine, et al. (2003). "Recent advances in the analysis of oxidized proteins." Amino Acids **25**(3-4): 221-6.
- Riva, A., B. Tandler, et al. (2006). "Structure of cristae in cardiac mitochondria of aged rat." Mech Ageing Dev **127**(12): 917-21.
- Riva, A., B. Tandler, et al. (2005). "Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H868-72.
- Robinson, C. E., A. Keshavarzian, et al. (1999). "Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting." Anal Biochem **266**(1): 48-57.
- Roche, M., P. Rondeau, et al. (2008). "The antioxidant properties of serum albumin." FEBS Lett **582**(13): 1783-7.
- Rodriguez-Roldan, V., J. M. Garcia-Heredia, et al. (2008). "Effect of nitration on the physicochemical and kinetic features of wild-type and monotyrosine mutants of human respiratory cytochrome c." Biochemistry **47**(47): 12371-9.
- Rojo, M., F. Legros, et al. (2002). "Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo." J Cell Sci **115**(Pt 8): 1663-74.
- Rosa, E. F., A. C. Silva, et al. (2005). "Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging." J Appl Physiol **99**(4): 1569-75.
- Rosca, M. G. and C. L. Hoppel (2009). "New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure." J Bioenerg Biomembr.
- Rothstein, M. (1985). "The alteration of enzymes in aging animals." Basic Life Sci **35**: 193-204.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, et al. (2003). "The role of mitochondrial oxidative stress in aging." Free Radic Biol Med **35**(1): 1-8.

- Scarpulla, R. C., K. M. Agne, et al. (1981). "Isolation and structure of a rat cytochrome c gene." J Biol Chem **256**(12): 6480-6.
- Schafer, E., N. A. Dencher, et al. (2007). "Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria." Biochemistry **46**(44): 12579-85.
- Schagger, H. (2001). "Respiratory chain supercomplexes." IUBMB Life **52**(3-5): 119-28.
- Schagger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 154-9.
- Schagger, H., W. A. Cramer, et al. (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal Biochem **217**(2): 220-30.
- Schagger, H., R. de Coo, et al. (2004). "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I." J Biol Chem **279**(35): 36349-53.
- Schagger, H. and K. Pfeiffer (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." EMBO J **19**(8): 1777-83.
- Scheffler, I. E. (2001). "A century of mitochondrial research: achievements and perspectives." Mitochondrion **1**(1): 3-31.
- Scheffler, I. E. (2001). "Mitochondria make a come back." Adv Drug Deliv Rev **49**(1-2): 3-26.
- Schon, E. A. and N. A. Dencher (2009). "Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes." Cell Metab **9**(1): 1-3.
- Schonhoff, C. M., B. Gaston, et al. (2003). "Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis." J Biol Chem **278**(20): 18265-70.
- Schulte, U. (2001). "Biogenesis of respiratory complex I." J Bioenerg Biomembr **33**(3): 205-12.
- Shacter, E. (2000). "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples." Drug Metab Rev **32**(3-4): 307-26.
- Sharma, L. K., J. Lu, et al. (2009). "Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases." Curr Med Chem **16**(10): 1266-77.
- Short, K. R., M. L. Bigelow, et al. (2005). "Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(15): 5618-23.
- Shringarpure, R. and K. J. Davies (2002). "Protein turnover by the proteasome in aging and disease." Free Radic Biol Med **32**(11): 1084-9.
- Simon, N., C. Morin, et al. (2003). "Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria." Br J Pharmacol **138**(2): 369-76.
- Smith, H. T., A. J. Ahmed, et al. (1981). "Electrostatic interaction of cytochrome c with cytochrome c1 and cytochrome oxidase." J Biol Chem **256**(10): 4984-90.
- Solmaz, S. R. and C. Hunte (2008). "Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer." J Biol Chem **283**(25): 17542-9.
- Soskic, V., K. Groebe, et al. (2008). "Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing." Exp Gerontol **43**(4): 247-57.

- Souza, J. M., L. Castro, et al. (2008). "Nitrocytochrome c: synthesis, purification, and functional studies." Methods Enzymol **441**: 197-215.
- Souza, J. M., G. Peluffo, et al. (2008). "Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker?" Free Radic Biol Med **45**(4): 357-66.
- Squier, T. C. and D. J. Bigelow (2000). "Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis." Front Biosci **5**: D504-26.
- St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **277**(47): 44784-90.
- Stadtman, E. R. (2002). "Importance of individuality in oxidative stress and aging." Free Radic Biol Med **33**(5): 597-604.
- Stadtman, E. R. (2006). "Protein oxidation and aging." Free Radic Res **40**(12): 1250-8.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." Amino Acids **25**(3-4): 207-18.
- Starkov, A. A. (2008). "The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling." Ann N Y Acad Sci **1147**: 37-52.
- Stowe, D. F. (2009). "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function." Antioxid Redox Signal.
- Stuart, R. A. (2008). "Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria." J Bioenerg Biomembr **40**(5): 411-7.
- Suh, J. H., S. H. Heath, et al. (2003). "Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress." Free Radic Biol Med **35**(9): 1064-72.
- Sun, G. and V. E. Anderson (2004). "Prevention of artifactual protein oxidation generated during sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis." Electrophoresis **25**(7-8): 959-65.
- Szeto, H. H. (2006). "Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants." AAPS J **8**(2): E277-83.
- Taylor, R. W., M. A. Birch-Machin, et al. (1994). "The control of mitochondrial oxidations by complex III in rat muscle and liver mitochondria. Implications for our understanding of mitochondrial cytopathies in man." J Biol Chem **269**(5): 3523-8.
- Taylor, S. W., E. Fahy, et al. (2003). "Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins." J Biol Chem **278**(22): 19587-90.
- Terman, A. and U. T. Brunk (2004). "Myocyte aging and mitochondrial turnover." Exp Gerontol **39**(5): 701-5.
- Terman, A. and U. T. Brunk (2005). "The aging myocardium: roles of mitochondrial damage and lysosomal degradation." Heart Lung Circ **14**(2): 107-14.
- Terman, A., H. Dalen, et al. (2003). "Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis." Exp Gerontol **38**(8): 863-76.
- Terzioglu, M. and N. G. Larsson (2007). "Mitochondrial dysfunction in mammalian ageing." Novartis Found Symp **287**: 197-208; discussion 208-13.
- Thariat, J., F. Collin, et al. (2008). "Marked difference in cytochrome c oxidation mediated by HO(*) and/or O(2)(*-) free radicals in vitro." Biochimie **90**(10): 1442-51.

- Tibbits, G., B. J. Koziol, et al. (1978). "Adaptation of the rat myocardium to endurance training." J Appl Physiol **44**(1): 85-9.
- Trifunovic, A. and N. G. Larsson (2008). "Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing." J Intern Med **263**(2): 167-78.
- Turko, I. V. and F. Murad (2002). "Protein nitration in cardiovascular diseases." Pharmacol Rev **54**(4): 619-34.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-44.
- Ueta, E., T. Kamatani, et al. (2003). "Tyrosine-nitration of caspase 3 and cytochrome c does not suppress apoptosis induction in squamous cell carcinoma cells." Int J Cancer **103**(6): 717-22.
- Valdez, L. B., T. Zaobornyj, et al. (2004). "Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging." Mol Aspects Med **25**(1-2): 49-59.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- van der Loo, B., R. Labugger, et al. (2000). "Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging." J Exp Med **192**(12): 1731-44.
- Van Remmen, H. and A. Richardson (2001). "Oxidative damage to mitochondria and aging." Exp Gerontol **36**(7): 957-68.
- Vempati, U. D., X. Han, et al. (2009). "Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV." J Biol Chem **284**(7): 4383-91.
- Viappiani, S. and R. Schulz (2006). "Detection of specific nitrotyrosine-modified proteins as a marker of oxidative stress in cardiovascular disease." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(6): H2167-8.
- Vina, J., C. Borras, et al. (2007). "Theories of ageing." IUBMB Life **59**(4-5): 249-54.
- Vonck, J. and E. Schafer (2009). "Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 117-24.
- Weber, J. (2006). "ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1162-70.
- Wells-Knecht, M. C., T. J. Lyons, et al. (1997). "Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes." J Clin Invest **100**(4): 839-46.
- Wittig, I., R. Carrozzo, et al. (2006). "Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1066-72.
- Witze, E. S., W. M. Old, et al. (2007). "Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry." Nat Methods **4**(10): 798-806.
- Xu, K. Y., D. L. Huso, et al. (1999). "Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 657-62.
- Yaffe, M. P. (1999). "The machinery of mitochondrial inheritance and behavior." Science **283**(5407): 1493-7.
- Yamada, T., T. Mishima, et al. (2007). "Myofibrillar protein oxidation and contractile dysfunction in hyperthyroid rat diaphragm." J Appl Physiol **102**(5): 1850-5.

- Yamakura, F. and K. Ikeda (2006). "Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species." Nitric Oxide **14**(2): 152-61.
- Yamakura, F., H. Taka, et al. (1998). "Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine." J Biol Chem **273**(23): 14085-9.
- Yan, L. J., R. L. Levine, et al. (2000). "Effects of aging and hyperoxia on oxidative damage to cytochrome c in the housefly, *Musca domestica*." Free Radic Biol Med **29**(1): 90-7.
- Yu, C. A., H. Tian, et al. (1999). "Structural basis of multifunctional bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex." J Bioenerg Biomembr **31**(3): 191-9.
- Yu, H., I. Lee, et al. (2008). "Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 1066-71.
- Zhan, W. Z., J. G. Swallow, et al. (1999). "Effects of genetic selection and voluntary activity on the medial gastrocnemius muscle in house mice." J Appl Physiol **87**(6): 2326-33.
- Zhao, Y., Z. B. Wang, et al. (2003). "Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O₂^{*}- and H₂O₂ in mitochondria." J Biol Chem **278**(4): 2356-60.
- Zickermann, V., S. Drose, et al. (2008). "Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." J Bioenerg Biomembr **40**(5): 475-83.